

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

FREDERICO FONTANELLI VAZ

**PERFIL SANITÁRIO DE FILHOTES DE *Amazona brasiliensis* DE VIDA LIVRE NO  
PARANÁ: PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E PESQUISA DE  
AGENTES INFECCIOSOS**

CURITIBA

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

FREDERICO FONTANELLI VAZ

**PERFIL SANITÁRIO DE FILHOTES DE *Amazona brasiliensis* DE VIDA LIVRE NO  
PARANÁ: PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E PESQUISA DE  
AGENTES INFECCIOSOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Patologia Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Professora Dra. Rosângela Locatelli Dittrich

Comitê de Orientação: Professora Dra. Simone Tostes de Oliveira Stedile e Professor Dr. Ricardo Guilherme D'Otaviano de Castro Vilani

CURITIBA

2015

V393 Vaz, Frederico Fontanelli

Perfil sanitário de filhotes de *Amazona brasiliensis* de vida livre no Paraná : parâmetros hematológicos, bioquímicos e pesquisa de agentes infecciosos / Frederico Fontanelli Vaz. – Curitiba, 2015.  
98f. : il.

Orientador: Rosângela Locatelli Dittrich

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) –  
Universidade

Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

1. Papagaio (Ave) – Doenças 2. Hematologia veterinária.  
3. Gripe aviária. I. Dittrich, Rosângela Locatelli. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU 619.6:636.6

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “**PERFIL SANITÁRIO DE FILHOTES DE *AMAZONA BRASILIENSIS* DE VIDA LIVRE NO PARANÁ: PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E PESQUISA DE AGENTES INFECCIOSOS**” apresentada pelo Mestrando **FREDERICO FONTANELLI VAZ** declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou o candidato APROVADO para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 30 de março de 2015

Professora Dra. Rosângela Locatelli Dittrich  
Presidente/Orientadora

Professora Dra. Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt  
Membro

Professor Dr. Rogério Ribas Lange  
Membro

Dedico este trabalho aos papagaios-de-cara-roxa  
da Ilha Rasa, aves que levarei para sempre no coração.

A todas as espécies ameaçadas de extinção,  
que este trabalho seja útil e dê forças para o surgimento de outros.

À todos os seres vivos que têm voz, mas não são compreendidos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Rosangela Locatelli Dittrich pela confiança e excelente orientação nesses dois anos que passaram. Obrigado pela ideia do projeto, pelos ensinamentos, paciência, pela inspiração e incentivo para continuar na carreira acadêmica. Admiro muito seu trabalho como docente e pesquisadora.

Aos biólogos da Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental (SPVS) Elenise Angelotti Bastos Sipinski, Maria Cecília Abbud e Rafael Meirelles Sezerban, obrigado por todo suporte prestado nas expedições a campo, pelo carinho e pela receptividade. Foi incrível e inspirador conhecer de perto o trabalho de vocês e apreciar toda paixão e seriedade que empregam nele.

À médica veterinária Patrícia Pereira Serafini, analista ambiental do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, e ao Rafael Meurer, graduando de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, obrigado pelo auxílio nas coletas, pelos ensinamentos e pela grande ajuda nas análises microbiológicas.

Aos meus pais Marizilda e Ricardo, pelo apoio e incentivo aos meus estudos e por todo amor e valores passados. Ao meu avô Redeu, sem o qual eu não teria conquistado meus sonhos. Às minhas irmãs Bianca e Lívia, pela parceria e cumplicidade de sempre.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná Marília Koch, Carlos Kroetz, Rafael Hagi, Daniele Von Kruger, Sandra Seixas, Luciene Laskoski e Fabiana Tieme, obrigado por toda ajuda, pelas risadas, conversas e momentos de lazer. Ao bioquímico Olair Beltrame pela parceria e ajuda nos exames bioquímicos.

Aos meus amigos Juliana, Angélica, Ana Paula, San e Luiz, obrigado por me deixarem fazer parte das suas vidas e serem meu alicerce em Curitiba.

À Profa. Dra. Tânia de Freitas Raso da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, obrigado pelos ensinamentos e pela disposição e paciência nas análises de PCR.

Ao Prof. Dr. Edison Luis Durigon, ao Dr. Jansen de Araújo, Dr. Luciano Thomazelli e à Dra. Tatiana Ometto do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, obrigado pelo auxílio e disponibilidade nas análises de RT-PCR.

À bióloga Gislaine Fernandes do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, pela realização da sexagem dos papagaios.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná pelas oportunidades de aprendizado e pela busca da excelência em ensino e pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

Não faças do amanhã o sinônimo de nunca  
nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais

Teus passos ficaram

Olhes para trás...  
mas vá em frente  
pois há muitos que precisam que chegues para poderem seguir-te

(Charles Chaplin)



## RESUMO

Atualmente, há maior necessidade de pesquisas de doenças e estabelecimento de perfis hematológicos e bioquímicos em populações de aves ameaçadas de extinção. O acompanhamento da saúde desses animais deve ser encorajado pela crescente evidência de que certas enfermidades podem causar impactos adversos nessas populações, e estudos são escassos. O papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) é considerado uma espécie vulnerável, habitando a floresta atlântica do litoral sul de São Paulo, litoral do Paraná e litoral norte de Santa Catarina. Desde 1997, a Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental desenvolve o “Projeto de Conservação do Papagaio-de-cara-roxa”, numa tentativa de minimizar o declínio da população. Informações sobre valores hematológicos, bioquímicos e pesquisa de patógenos nesta espécie são raros. O presente trabalho foi dividido em três capítulos. O capítulo 1 objetivou estabelecer intervalos de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos em 37 filhotes saudáveis de *A. brasiliensis* de vida livre no estado do Paraná, sul do Brasil e comparar os resultados entre sexos. O capítulo 2 objetivou determinar os mesmos parâmetros em filhotes saudáveis e doentes e comparar os resultados entre grupos que apresentaram diferentes sinais clínicos com um grupo saudável clinicamente. O capítulo 3 objetivou determinar a microbiota de 38 filhotes, comparando-a entre aves provenientes de dois tipos de ninhos (madeira e PVC) e pesquisar patógenos por reação em cadeia da polimerase (*Chlamydophila psittaci*, vírus da influenza aviária, da doença de Newcastle e da Febre do oeste do Nilo) e anticorpos para *C. psittaci* pelo teste de ELISA modificado, em 50 e 64 indivíduos, respectivamente. As coletas de sangue foram realizadas por meio de seringas e agulhas de insulina estéreis, e amostras de cloaca e orofaringe foram obtidas por swabs estéreis. Médias significativamente superiores para colesterol foram encontradas em fêmeas. O exame físico indicou 37 aves clinicamente sadias, 26 com anormalidades discretas e 5 com alterações graves, e os papagaios foram divididos em 7 grupos de acordo com os achados clínicos. Médias significativamente diferentes entre os grupos foram observadas para os parâmetros hemoglobina, volume globular médio, heterófilo absoluto, relação heterófilo:linfócito, proteína plasmática total, proteína total, glicose, lactato desidrogenase, creatina quinase, globulinas, cálcio e fósforo. Foram isoladas 125 colônias bacterianas com identificação de 19 espécies e três gêneros. As

espécies com maior prevalência de isolamento foram *Escherichia coli* (70,73%), *Klebsiella oxytoca* (39,13%), *Klebsiella pneumoniae* (30,43%) e *Enterobacter aerogenes* (30,43%). *Salmonella enteritidis* foi detectada em três amostras. A microbiota dos papagaios não diferiu em relação ao tipo de ninho. Todas as amostras para pesquisa de patógenos e anticorpos foram negativas. Os resultados possibilitaram a obtenção de dados ainda não descritos para a espécie no estado do Paraná e o fornecimento de um ponto de referência para futuras avaliações e interpretações de resultados laboratoriais, contribuindo com planos de conservação.

**Palavras- chave:** *Amazona brasiliensis*, perfil sanitário, hematologia, bioquímica, *Chlamydophila psittaci*, influenza vírus aviário.

## ABSTRACT

There is a greater need for an increase effort in research on disease and determination of hematologic and biochemical profiles in endangered avian populations. Health monitoring of these animals should be encouraged in light of increasing evidence that disease has an adverse impact on avian populations. The red-tailed Amazon parrot (*Amazona brasiliensis*) is a vulnerable species and is endemic in the Atlantic Forest, inhabiting coastal regions in the south-east Brazilian states of São Paulo, Parana and Santa Catarina. A conservation project for *A. brasiliensis* has been developed by the non-profitable organization Society for Wildlife Research and Environmental Education since 1997, to minimize the population decline. Information about hematology, biochemical and diseases in this species are rare. This study was split into three chapters. Chapter 1 aimed to determine reference intervals for hematologic and biochemical parameters of 37 free-living *A. brasiliensis* healthy nestlings in Parana state, southern Brazil, and compare the results between sexes. Chapter 2 aimed to determine the same parameters in healthy and sick nestlings and compare the results between groups with different clinical findings. Chapter 3 aimed to determine the microbiota of 38 nestlings, comparing the results between birds from two types of nests (wood and PVC); also aimed to detect pathogens by polymerase chain reaction (*Chlamydophila psittaci*, avian influenza virus, Newcastle disease virus and west Nile virus) and to detect antibodies to *C. psittaci* by modified ELISA test, in 50 and 64 parrots, respectively.

Blood samples were collected in sterile syringes using insulin needles, and cloacal and oropharyngeal samples were collected using sterile swabs. Significantly higher values of cholesterol were observed in females. Physical examinations indicated that 37 birds were clinically healthy, 26 had mild abnormalities and 5 had severe disorders, and the parrots were split into 7 groups according to clinical findings. Significantly different means were observed for hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, absolute heterophil, heterophil:lymphocyte ratio, total plasma protein, total protein, glucose, lactate dehydrogenase, creatine kinase, globulin, calcium and phosphorus. 125 bacterial colonies were isolated and 19 species and 3 genera were identified. The species with the highest prevalence were *Escherichia coli* (70.73%), *Klebsiella oxytoca* (39.13%), *Klebsiella pneumoniae* (30.43%) and *Enterobacter aerogenes* (30.43%). *Salmonella enteritidis* was detected in three samples. The microbiota of parrots did not differ between the types of nest. All samples tested by ELISA and PCR were negative. The results allowed obtaining data not yet described for this species in Parana state, providing a reference point for future assessments and interpretations of laboratory results, contributing to the conservation plans.

**Key words:** *Amazona brasiliensis*, health profile, hematology, biochemistry, *Chlamydophila psittaci*, avian influenza virus.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

TABELA 1 - Hematologic and total plasma protein reference intervals for healthy free-living Red-tailed Amazon parrots (*Amazona brasiliensis*) nestlings in Parana state, Brazil.....29

TABELA 2 – Plasma biochemical reference intervals for healthy free-living Red-tailed Amazon parrots (*Amazona brasiliensis*) nestlings in Parana state, Brazil .....30

TABELA 3 - Hematological and total plasma protein values (mean values, standard deviations and range) for free-living Red-tailed Amazon parrots (*Amazona brasiliensis*) nestlings according to sex, in Parana state, Brazil.....31

TABELA 4 - Plasma biochemical values (mean values, standard deviations and range) for free-living Red-tailed Amazon parrots (*Amazona brasiliensis*) nestlings according to sex, in Parana state, Brazil .....32

### CAPÍTULO 2

TABELA 1 - Achados clínicos de 68 filhotes de papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) de vida livre no estado do Paraná, Brasil.....51

TABELA 2 - Parâmetros hematológicos e de proteína plasmática total (médias e desvios padrão) para filhotes de papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) de vida livre de acordo com o achado clínico, no estado do Paraná, Brasil.....52

TABELA 3 - Parâmetros bioquímicos (médias e desvios padrão) para filhotes de papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) de vida livre de acordo com o achado clínico, no estado do Paraná, Brasil.....53

### CAPÍTULO 3

TABELA 1 - Prevalência de bactérias isoladas de swab cloacal e de orofaringe de acordo com o ninho em filhotes de papagaio-de-cara-roxa ( <i>Amazona brasiliensis</i> ) de vida livre no estado do Paraná.....	71
--	----

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

‰: porcentagem

°C: grau Celsius

A/G: Albumina/Globulina.

AST: aspartato aminotransferase

*C. psittaci Chlamydophila psittaci*

CI: Confidence Interval

CK: creatina quinase

Dist: distribuição

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DP: Desvio-Padrão

ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay

*et al.: (et alii) e outros*

G: Gaussiano

g: grama

GGT: gama-glutamyl transferase

H:L: Heterophil:lymphocyte.

IC: Intervalo de Confiança

IR: Intervalo de Referência

LDH: lactato desidrogenase

Lim Ref: Limite de Referência

LL: larvae lesions

Máx: Máximo

Max: Maximum

MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration

MCV: mean corpuscular volume

mg: micrograma

Mín: Mínimo

Min: Minimum

mL: mililitro

MRA: mild respiratory abnormalities

n: número de amostras

NE: Normal Examination

NG: Não Gaussiano.

OBA: old beak abnormalities

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

PCV: packed cell volume

PE: Presence of ectoparasites

PR: Paraná

RBC: red blood cells

RDN: robusto com dados não transformados

RDT: robusto com dados transformados

Ref Limit Reference Limit

RI: Reference Interval

RNA: ácido ribonucléico

Rt-PCR: Polymerase Chain Reaction *real time*

SCA: several clinical abnormalities

SD: Standard Deviation

SDN: standard com dados não transformados

SdT: standard com dados transformados

Taq: *Thermus aquaticus*

TPP: Total Plasma Protein

UFPR: Universidade Federal do Paraná

USP: Universidade de São Paulo

WBC: White blood cells

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b>	17
1.1 HIPÓTESES	20
1.2 OBJETIVOS	21
1.2.1 Objetivo geral	21
1.2.2 Objetivos específicos	21
REFERÊNCIAS	22
<b>2 HEMATOLOGIC AND BIOCHEMICAL REFERENCE INTERVALS OF FREE-LIVING RED-TAILED AMAZON PARROTS (<i>Amazona brasiliensis</i>) NESTLINGS IN PARANA STATE, BRAZIL</b>	24
ABSTRACT	24
2.1 INTRODUCTION	25
2.2 MATERIALS E METHODS	26
2.3 RESULTS	28
2.4 DISCUSSION	31
2.5 CONCLUSION	38
REFERENCES	39
<b>3 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS EM FILHOTES DE PAPAGAIO-DE-CARA-ROXA (<i>Amazona brasiliensis</i>) SAUDÁVEIS E DOENTES DE VIDA LIVRE NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL</b>	44
RESUMO	44
ABSTRACT	45
3.1 INTRODUÇÃO	46
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	47
3.3 RESULTADOS	49
3.4 DISCUSSÃO	54
3.5 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59
<b>4 PESQUISA DE ENTEROBACTÉRIAS E AGENTES INFECCIOSOS EM FILHOTES DE PAPAGAIO-DE-CARA-ROXA (<i>Amazona brasiliensis</i>) DE VIDA LIVRE NO PARANÁ</b>	63
RESUMO	63
ABSTRACT	64



4.1 INTRODUÇÃO.....	65
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	67
4.2.1 Área de estudo e coleta de amostras.....	67
4.2.2 Pesquisa de anticorpos .....	68
4.2.3 Análises microbiológicas .....	68
4.2.4 Reação em cadeia da polimerase convencional .....	69
4.2.5 Reação em cadeia da polimerase em tempo real .....	69
4.2.6 Análise estatística .....	70
4.3 RESULTADOS .....	70
4.4 DISCUSSÃO.....	72
4.4.1 Análise microbiológica .....	72
4.4.2 Pesquisa de anticorpos e reação em cadeia da polímerase .....	74
4.5 CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>81</b>
<b>6. ANEXOS.....</b>	<b>82</b>
6.1 CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA SCA.....	82
6.2 CERTIFICADO DE AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA – SISBIO.....	83
6.3 RESUMO APRESENTADO NO XVII CONGRESSO E XXIII ENCONTRO DA ABRAVAS 2014.....	87

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, há maior necessidade de pesquisas de doenças e estabelecimento de perfis hematológicos e bioquímicos em populações de aves ameaçadas ou em perigo de extinção (FRIEND *et al.* 2001). O acompanhamento da saúde desses animais deve ser encorajado pela crescente evidência de que certas enfermidades podem causar impactos adversos nessas populações (GILARDI *et al.*, 1995). Além disso, aves de vida livre capturadas para o comércio ilegal passam a ter contato com seres humanos e também com outras aves apreendidas ou existentes em cativeiro, podendo carrear zoonoses e disseminar doenças.

Iniciativas proativas de diagnóstico de enfermidades e exames clínicos e complementares são essenciais para reduzir o efeito de ameaças de doenças e entender os padrões epidemiológicos da infecção (FRIEND e THOMAS, 1992). Programas de monitoramento de doenças que envolvam metodologias de vigilância de populações podem elucidar mudanças na sanidade destas, antes da ocorrência de alterações em seu tamanho ou estrutura (KARESH *et al.*, 1997).

Os papagaios são um importante e conveniente grupo de aves para o direcionamento de estudos de monitoramento de doenças, correspondendo à família com maior proporção (28%) de espécies ameaçadas e maior pesquisa e avanços na identificação de doenças, já que são aves adquiridas popularmente como animais de estimação (SNYDER *et al.*, 1999). Embora o diagnóstico de doenças e manejo clínico de papagaios cativos seja uma especialidade em expansão, as doenças de populações de papagaios de vida livre têm recebido relativamente pouca atenção e são escassos, sendo a maior parte do conhecimento voltada a estudos retrospectivos de ocorrência de mortalidade ou estudos de indivíduos, e não de populações (SPALDING e FORRESTER, 1993; GILARDI *et al.*, 1995; KARESH *et al.*, 1997; FRIEND *et al.*, 2001; MASELLO; QUILLFELDT, 2004). Isto também vale para os parâmetros de patologia clínica, importantes para o auxílio diagnóstico e acompanhamento da saúde dos animais. Valores hematológicos e bioquímicos de referência em animais de vida livre são raros, devido principalmente à dificuldade de obtenção de amostras (MASELLO; QUILLFELDT, 2004).

Os papagaios do gênero *Amazona* apresentam 31 espécies distribuídas por toda a América Central e do Sul, e no Brasil ocorrem em todos os biomas: Amazônia, floresta atlântica, cerrado, pantanal, caatinga e nos pampas (SCHUNCK *et al.*, 2011). Das 31 espécies, 18 estão listadas como vulnerável, em perigo ou criticamente ameaçada (RUSSELLO; AMATO, 2002; MARTINEZ; PRESTES, 2008). Na floresta atlântica, o papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*) e o papagaio-chauá (*Amazona rhodocorytha*) são considerados em perigo e o papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) e papagaio-charão (*Amazona petrei*) são considerados vulneráveis, sendo que os três primeiros apresentam endemismo (SCHUNCK *et al.*, 2011; IUCN, 2015).

O papagaio-de-cara-roxa habita a floresta atlântica do litoral sul de São Paulo, litoral do Paraná e litoral norte de Santa Catarina. A espécie é encontrada geralmente até 300 metros de altitude e raramente acima de 700 metros, sendo que 75% da população está localizada no litoral do estado do Paraná nas regiões da Área de Proteção Ambiental de Guaraqueçaba, do Parque Nacional de Superagui e da Estação Ecológica de Guaraqueçaba, nos municípios de Guaraqueçaba, Antonina, Morretes, Matinhos e Guaratuba, além das ilhas do Mel, Rasa da Contiga, Rasa, das Peças e de Superagui (SCHERER-NETO, 1989; SIPINSKI, 2003; BÓÇON *et al.*, 2004; SCHERER-NETO; TOLEDO, 2007). Em São Paulo, o papagaio é encontrado nos municípios de Mongaguá, Itanhaém, Peruíbe, Iguapé, Ilha Comprida e Cananéia (SCHERER-NETO, 1989; MARTUSCELLI, 1995). Há poucas informações sobre a população localizada no estado de Santa Catarina (SCHUNCK *et al.*, 2011).

O *A. brasiliensis* alimenta-se principalmente de frutas (baga, cápsula e drupa), mas também de folhas, flores, sementes e néctar de pelos menos 68 espécies vegetais, tendo preferência por guanandi (*Calophyllum brasiliense*), jerivá (*Syagrus romanzoffianum*; Arecaceae), araçá (*Psidium cattleianum*; Myrtaceae), mangue-do-mato (*Clusia criuva*; Clusiaceae), palmito-juçara (*Euterpe edulis*), pinheiro-bravo (*Podocarpus sellowii*), mangue-vermelho (*Rhizophora mangle*) e candiúva (*Trema micranta*) (MARTUSCELLI, 1995; SCHUNCK *et al.*, 2011).

Considerado uma espécie bioindicadora por sua sensibilidade a mudanças no ambiente, o papagaio-de-cara-roxa vem sofrendo declínio na sua

população principalmente devido à destruição do seu *habitat* pela pressão imobiliária, o fato de ocorrer em uma área reduzida, e pela captura de espécimes para o comércio ilegal (GALETTI *et al.*, 2006).

Desde 1997, a Sociedade de Pesquisas em Vida Selvagem e Educação Ambiental (SPVS) desenvolve o “Projeto de Conservação do Papagaio-de-Cara-Roxa” (SCHUNCK *et al.*, 2011), cujo objetivo é “proteger o papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*), por meio de conhecimento científico, do manejo e sensibilização da sociedade quanto à importância da conservação do papagaio e da biodiversidade da floresta atlântica”, numa tentativa de minimizar o declínio da população da espécie. Em 1998, ocorreu uma expansão do projeto, que passou a monitorar aspectos reprodutivos da espécie nas ilhas Rasa, Gamelas e Grande do litoral do Paraná (SPVS, 1999). Em 2003, a SPVS optou por instalar ninhos artificiais de madeira, e após três anos, os ninhos de PVC, os quais passaram a ser utilizados pelos papagaios. A partir de então, censos anuais foram realizados no estado do Paraná e o monitoramento dos ninhos para observação do desenvolvimento dos filhotes.

Os censos realizados pela SPVS em cinco dormitórios no estado do Paraná por 12 anos demonstraram que a espécie apresentou uma tendência de estabilidade populacional até o ano de 2013 (SIPINSKI *et al.*, 2014), tendo como positivo o resultado do trabalho de conservação das áreas em que o animal vive. A estimativa da população é de 6650 indivíduos em toda área de ocorrência, sendo 5000 no estado do Paraná e 1670 no estado de São Paulo (SCHUNCK *et al.*, 2011). Também como reflexo dos esforços da SPVS, o papagaio saiu no final de 2014 da Lista de Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção, divulgada pelo Ministério do Meio Ambiente, passando de “vulnerável” para “quase ameaçada” (ICMBio, 2014).

Juntamente a esta instituição, o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, uma autarquia em regime especial vinculada ao Ministério do Meio Ambiente, elaborou o “Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Papagaios da Mata Atlântica”, no qual o *A. brasiliensis* está inserido. A meta III do Plano de Ação é a “ampliação do conhecimento científico sobre as espécies-alvo do Plano”, na qual está inserida a ação 3.10 de “caracterizar o perfil sanitário das populações do papagaio-de-cara-roxa em vida livre” (SCHUNCK *et al.*, 2011).

Muitos patógenos que ocorrem comumente em psitacídeos são pouco estudados em populações de vida livre no Brasil (RASO *et al.*, 2006), e raramente reportados para a espécie *A. brasiliensis*, assim como o estabelecimento de perfis hematológicos e bioquímicos, sendo necessárias novas pesquisas. Estas possibilitariam avaliar o estado sanitário destas aves que ocorrem no estado do Paraná, importante para o monitoramento da saúde da população, para estabelecer um banco de dados pouco existente ainda para a espécie, contemplar a ação 3.10 do Plano de Ação e auxiliar os planos de conservação da mesma.

A partir da necessidade de novas pesquisas, o presente trabalho foi desenvolvido e dividido em três capítulos. O primeiro capítulo aborda o estabelecimento de intervalos de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos em filhotes saudáveis de papagaio-de-cara-roxa, com o título: Hematologic and biochemical reference intervals of free-living Red-tailed Amazon parrots (*Amazona brasiliensis*) nestlings in Parana state, Brazil. O segundo capítulo aborda os mesmos parâmetros, mas em indivíduos saudáveis e doentes, comparando os resultados entre grupos com variadas manifestações clínicas, cujo título é: Parâmetros hematológicos e bioquímicos em filhotes de papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) saudáveis e doentes de vida livre no estado do Paraná, Brasil. O terceiro capítulo aborda o estabelecimento de padrões microbiológicos de referência para os filhotes e a investigação de patógenos, com o título: Pesquisa de enterobactérias e agentes infecciosos em filhotes de papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) de vida livre no Paraná

## 1.1 HIPÓTESES

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos são iguais entre os filhotes de *A. brasiliensis* de sexos diferentes.

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos são iguais entre os filhotes de *A. brasiliensis* com diferentes sinais clínicos.

Os filhotes de *A. brasiliensis* pesquisados possuem microbiota igual entre os diferentes tipos de ninho (madeira e PVC).

Os filhotes de *A. brasiliensis* analisados são soropositivos para *Chlamydophila psittaci* e com diagnóstico positivo para as doenças de Newcastle, da febre do Oeste do Nilo, da influenza aviária e para *C. psittaci*.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo geral**

Este estudo objetivou estabelecer índices de referência de saúde, incluindo parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos, identificar a microbiota cloacal e de orofaringe, detectar a presença de agentes infecciosos e de taxas de endo e ectoparasitoses em filhotes de indivíduos de papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) de vida livre no estado do Paraná.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- 1 – Estabelecer intervalos de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos em filhotes saudáveis de *A. brasiliensis* de vida livre;
- 2 – Comparar os parâmetros hematológicos e bioquímicos de acordo com o sexo das aves;
- 3 – Determinar parâmetros hematológicos e bioquímicos em filhotes saudáveis e doentes de *A. brasiliensis* de vida livre;
- 4 - Comparar os parâmetros hematológicos e bioquímicos entre grupos que apresentaram diferentes sinais clínicos com um grupo clinicamente saudável;
- 5 - Identificar os tipos de bactérias da cloaca e da orofaringe de filhotes de papagaio-de-cara-roxa de vida livre e estabelecer padrões de referência para a espécie;
- 6 - Comparar a microbiota dos filhotes nos dois tipos de ninhos utilizados (madeira e PVC);
- 7- Pesquisar os agentes infecciosos *Chlamydophila psittaci*, vírus da influenza aviária, Paramyxovirus-1, Paramyxovirus-2 e vírus da febre do oeste do Nilo nos filhotes.

## REFERÊNCIAS

- BOÇON, R.; SIPINKI, E.A.B; BOSS, R.L.; RIVEIRA, R. 2004. A importância do Parque Nacional de Superagui na Conservação do papagaio-de-cara-roxa. In: Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação, 4., 2004, Curitiba, **Anais...** Curitiba: Sociedade Brasileira de Ornitologia, 2004.
- FRIEND, M.; MCLEAN, R. G.; DEIN, F. J. Disease emergence in birds: challenges for the twenty-first century. **The Auk**, v. 118, n. 2, p. 290–303, 2001.
- FRIEND, M.; THOMAS, N. Disease prevention and control in endangered avian species: Special considerations and needs. **Acts Congressus Internationalis Ornithologici**, v. 20, p. 2331-2337, 1992.
- GALETTI, M.; SCHUNCK, F.; RIBEIRO, M.; PAIVA, A. A.; TOLEDO, R.; FONSECA, L. Distribuição e tamanho populacional do papagaio-de-cara-roxa *Amazona brasiliensis* no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 14, n.3, p. 239-247, 2006.
- GILARDI, K. V. K.; LOWENSTINE, L. J.; GILARDI, J. D.; MUNN, C. A. A survey for selected viral, chlamydial, and parasitic diseases in wild dusky-headed parakeets (*Aratinga weddellii*) and tui parakeets (*Brotogeris sanctithomae*) in Peru. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 31, n. 4, p. 523-528, 1995.
- ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Espécies ameaçadas – Lista 2014**. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies.html>>. Acesso em: 26/03/2015.
- IUCN 2015. **IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3**. Disponível em: <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em: 26/03/2015.
- KARESH, W. B.; DEL CAMPO, A.; BRASELTON, W. E.; PUCHE, H.; COOK, R. A. Health evaluation of free-ranging and hand-reared macaws (*Ara* spp.) in Peru. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 28, n. 4, p. 368-377, 1997.
- MARTINEZ, J.; PRESTES, N. P. **Biologia da Conservação**: estudo de caso com o papagaio-charão e outros papagaios brasileiros. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2008. 287 p.
- MARTUSCELLI, P. Ecology and conservation of the Red-tailed Amazon, *Amazona brasiliensis* in southeastern Brazil. **Bird Conservation International**, v. 5, p. 225 – 240, 1995.
- MASELLO, J. F.; QUILLFELDT, P. Are haematological parameters related to body condition, ornamentation and breeding success in wild burrowing parrots *Cyanoliseus patagonus*? **Journal of Avian Biology**, v. 35, p. 445-454, 2004.

RASO, T. F.; SEIXAS, G. H. F.; GUEDES, N. M. R.; PINTO, A. A. *Chlamydophila psittaci* in free-living Blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) and Hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 117, p. 235–241, 2006.

RUSSELLO M. A.; AMATO, G. A molecular phylogeny of *Amazona*: applications for Neotropical parrot biogeography, taxonomy, and conservation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 30, p. 421–437, 2004.

SCHERER-NETO, P. **Contribuição à biologia do papagaio-de-cara-roxa, *Amazona brasiliensis* (Linnaeus, 1758) (Aves, Psittacidae)**. Curitiba. 170 p. 1989. Dissertação (Mestrado em Zoologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1989.

SCHERER-NETO, P.; TOLEDO, M. C. B. Avaliação populacional do papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) (*Psittacidae*) no Estado do Paraná, Brasil. **Ornitologia Neotropical**, v. 18, p. 379-393, 2007.

SCHUNCK, F.; SOMENZARI, M.; LUGARINI, C.; SOARES, E. S.; RUPP, A. E.; BODRATI, A.; GIORGI, A. P.; WAJNTAL, A.; MIYAKI, C. Y.; SIPINSKI, E. A.; SEIXAS, G. H. F.; MARTINEZ, J.; FERREIRA, J. M.; COCKLE, K.; ABE, L. M.; KLEMMANN JUNIOR, L.; PRESTES, N. P.; SERAFINI, P. P.; SCHERER-NETO, P.; CAPARROZ, R. **Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Papagaios da Mata Atlântica**. Brasília: ICMBio, 2011. 128p.

SIPINSKI, E. A. B. **O papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) na Ilha Rasa, PR - Aspectos ecológicos e reprodutivos e relação com o ambiente**. Curitiba. 74 p. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

SIPINSKI, E. A. B.; ABBUD, M. C.; SEZERBAN, R. M.; SERAFINI, P. P.; BOÇON, R.; MANICA, L. T.; GUARALDO, A. C. Tendência populacional do papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) no litoral do estado do Paraná. **Ornithologia**, v. 6, n. 2, p. 136,143, 2014.

SNYDER, N. F. R.; MCGOWAN, P.; GILARDI, J.; GRAJAL, A. Parrots—Status Survey and Conservation Action Plan. **IUCN**, Gland, Switzerland and Cambridge, Reino Unido, 1999.

SPALDING, M. G.; FORRESTER, D. J. Disease monitoring of free-ranging and released wildlife. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 24, n. 3, p. 271-280, 1993.

SPVS – SOCIEDADE DE PESQUISA EM VIDA SELVAGEM E EDUCAÇÃO AMBIENTAL. 1999. Projeto saúde comunitária, educação e conservação para a região de Guaraqueçaba, Paraná, Brasil. **Relatório de atividades 1998**. Curitiba



## **2. CAPÍTULO 1. HEMATOLOGIC AND BIOCHEMICAL REFERENCE INTERVALS OF FREE-LIVING RED-TAILED AMAZON PARROTS (*Amazona brasiliensis*) NESTLINGS IN PARANÁ STATE, BRAZIL**

### **ABSTRACT**

The red-tailed Amazon parrot (*Amazona brasiliensis*) is an endangered species of psittacine. There is little information about hematologic and biochemical parameters of this species. The purpose of this study was to determine hematologic and biochemical reference intervals (RIs) for free-living *A. brasiliensis* nestlings in Paraná state, Brazil, and compare the results between genders. Sixty-eight parrots from the Environmental Protection Area of Guaraqueçaba were taken from the nest and physically restrained for clinical examination and blood collection. Sex was determined by polymerase chain reaction method using blood samples. RIs were determined as recommended by the ASVCP guidelines in healthy nestlings. Comparison between groups was analyzed using Mann-Whitney test or Student's *t* test. Clinical examinations indicated that 37 birds were in good health. Sex identification results showed 12 females and 25 males. The reference intervals for hematologic and biochemical values obtained from clinically healthy parrots, respectively, were as follows: RBC 1.1-2.6  $10^6/\mu\text{L}$ , PCV 29.1-50.3 %, hemoglobin 7.2-12.9 g/dL, MCV 152-293 fL, MCHC 22.2-28.4 g/dL, WBCs 4.9-28.5  $10^3/\mu\text{L}$ , heterophils 9.6-77.7%, lymphocytes 17.0-88.1%, monocytes 0.0-6.0%, eosinophils 0.0-5.0%, basophils 0.0-7.0%, heterophil:lymphocyte ratio 0.0-2.2, TPP 2.1-3.7 g/dL, uric acid 0.5-2.0 mg/dL; glucose 184.9-284.3 mg/dL; AST 100.3-226.6 U/L; LDH 178.1-927.7 U/L; CK 149.8-1144.0; cholesterol 137.5-256.9; total protein 1.8-3.0; albumin 0.9-1.6; globulin 0.5-1.6; A/G ratio 0.7-1.7; calcium 7.0-8.6; phosphorus 2.9-6.1. Significantly higher values ( $P<0.05$ ) of cholesterol were observed in females. This is the first study to establish hematologic and biochemical RIs for free-living *A. brasiliensis* nestlings in Paraná state. Hematologic and biochemical parameters are important tools to evaluate health status of free-living birds, supporting conservation plans for endangered species.

**Key words:** avian hematology, biochemical, hematologic parameters, reference intervals, Psittacidae

## 2.1 INTRODUCTION

Studies related to free-living birds have become important in recent years, especially when they involve conservation of endangered species (LIMIÑANA *et al.*, 2009). These initiatives allow the determination of a baseline data and to evaluate the effects of domestic animals, human, and wildlife interactions in the area (KARESH *et al.*, 1997; DEEM *et al.*, 2005; STONE *et al.*, 2005). Furthermore, they are important for the management, conservation and health monitoring in these species, because certain diseases may severely impact their populations (GILARDI *et al.*, 1995).

There are few studies regarding the health status of free-living birds. Hematologic and biochemical reference values are rare, mainly due to difficulties in obtaining blood samples (MASELLO; LANZQUILLFELDT, 2004). Because the clinical signs of illness in birds are frequently subtle, clinical chemistry and hematology are necessary to evaluate cellular change (HOCHLEITHNER, 1994).

These parameters are one of the most uncomplicated, easy and less invasive analysis to evaluate the physiological and health status of a natural population of vertebrates, and allow the detection of changes in physiological, pathological, ecological and environmental conditions in natural populations (ARTACHO *et al.*, 2007). In wild bird populations, clinical pathology is one of the most useful techniques to assess health status, body condition and changes in nutritional state (ARTACHO *et al.*, 2007).

The Psittacidae family is an important and a convenient group of birds to target for disease-monitoring programs, because the family contains one of the highest proportions of threatened species (28%) for any major family of birds (SNYDER *et al.*, 2000).

Health studies of free-living parrots have been performed in *Amazona brasiliensis* (CAVALHEIRO, 1999), *A. aestiva* (DEEM *et al.*, 2008), *A. autumnalis*, *A. oratrix* and *A. viridigenalis* (STONE *et al.*, 2005). Differences between males and females for hematologic and biochemical values have been performed in psittacine birds, such as *Amazona guildingii* (DEEM *et al.*, 2008) and *Anodorhynchus hyacinthinus* (ALLGAYER *et al.*, 2009; KOLENISKOVAS *et al.*, 2012).

The red-tailed Amazon parrot (*A. brasiliensis*) is endemic in the atlantic forest, inhabiting coastal regions in the Brazilian states of São Paulo, Paraná and Santa Catarina (CARRILO; BATISTA, 2007). This species is listed as vulnerable according to the International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened Species. Its major threats are habitat loss and poaching/trapping for illegal trade (ICMBio, 2011; IUCN, 2015).

A conservation project for *A. brasiliensis* has been developed by the non-profitable organization Society for Wildlife Research and Environmental Education (SPVS - [www.spvs.org.br](http://www.spvs.org.br)) since 1997. The main project objectives are to 'protect the red-tailed Amazon parrot, based on scientific knowledge, specific management and education, making people conscious of the relevance to conserve the species and the atlantic forest biodiversity' (SPVS, 1999).

The purpose of this study was to determine hematologic and biochemical reference intervals for free-living Red-tailed Amazon parrots nestlings in Parana state, Brazil. In addition, we investigated whether sex had an influence on hematologic and biochemical parameters in this species.

## **2.2 MATERIALS AND METHODS**

The research was conducted in the Ilha Rasa, an island belonging to Environmental Protection Area (EPA) of Guaraqueçaba, which is the best-preserved area of continuous Atlantic Forest left in Brazil (25° 15' - 25° 30' S; 48° 20' - 48° 30' W) (SPVS, 1992; CARRILO; BATISTA, 2007). EPA is a conservation unit that does not allow direct economic use. However, deforestation is still a reality, as well as animal trafficking, which especially affects the endangered Red-tailed Amazon parrot (SPVS, 1992; CARRILO; BATISTA, 2007).

A total of 68 nestlings were evaluated. Blood samples were collected during two months (December to January) in five field shipments, during the species reproductive period. The nests on the trees were accessed by climbing equipment and ladders. The nestlings were taken from the natural or artificial nest (made of wood or polyvinyl chloride) and manually restrained for clinical examination and sample collection. Blood samples were collected from the superficial ulnar vein in 1 mL syringes pretreated with 1000 IU sodium heparin.

Thin blood smears on glass slides were made immediately after the blood collection. These procedures were performed by the same veterinarian, for quality assurance control. All samples were kept in tubes on ice and send to the Veterinary Clinical Pathology Laboratory of the Federal University of Paraná (Curitiba, Paraná, Brazil), within 24 hours.

Hematologic parameters included red blood cell (RBC) count, packed cell volume (PCV), hemoglobin concentration, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), white blood cell (WBC) count, leukocyte differential count and heterophil:lymphocyte (H:L) ratio. PCV was determined with microhematocrit method and centrifuged at 12,000 g for 5 minutes; hemoglobin concentration was determined by cyanmethemoglobin method (Labtest kit, Lagoa Santana, MG, Brazil), in a semiautomatized hematology analyzer (Mindray BA-88A), after centrifugation of lysates (ZINKL, 1986). RBC and WBC counts were performed by the same person in a Neubauer hemocytometer chamber using blood diluted on 0.01% toluidine blue stain (ZINKL, 1986). Leukocyte differential count was performed on a total of 100 WBCs on blood smears stained with Wright's stain. The total plasma protein was determined using a refractometer (ZINKL, 1986).

The samples were centrifuged to obtain plasma samples. Biochemical analyses were carried using an automated analyzer BS-200 (Mindray®). The kits for Biochemical dosages from Kovalent (Kovalent do Brazil Ltda - São Gonçalo - RJ) were used in this study.

The parameters and respective methods used for the analyses were: uric acid (enzymatic test TBHBA); glucose (glucose oxidase); aspartate aminotransferase (AST) (optimized UV method, according to IFCC); lactate dehydrogenase (LDH) (UV – Kinetic Method, according to IFCC); gamma glutamyl transferase - GGT (colorimetric kinetic method); creatine kinase (CK) (optimized UV method, according to IFCC- DGKC); cholesterol (enzymatic, CHOD-PAP method); total protein (biuret method); albumin (bromocresol green); globulin (calculated by subtracting albumin from total protein levels); albumin/globulin ratio – A/G (calculated); calcium (photometric method with Arsenazo III); phosphorus (photometric method).

Sex was determined by polymerase chain reaction (PCR)-based method in blood samples in Biodiversity and Genetics Laboratory of the Brasilia University (GRIFFITHS *et al.*, 1998; MYIAKI *et al.*, 1998).

Thirty-seven fecal samples were collected from any bird that defecated during handling and kept under refrigeration. The samples were analyzed by direct and simple flotation methods three days after collection (WILLIS, 1921).

RI's were determined using an Excel (Excel; Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) spreadsheet with the Reference Value Advisor (version 2.0) set of macroinstructions that performs computations following the IFCC-CLSI recommendations as also suggested by ASVCP guidelines (ASVCP, 2011; GEFFRÉ *et al.*, 2011). The comparison between genders was done by using Portal Action 2.6 and statistical significance was set at  $P < 0.05$ . Normal distribution was verified by the Shapiro-Wilk test. Values that were normally distributed were compared by Student's *t* test. Nonparametric values were compared by the Mann-Whitney-Wilcoxon test.

## 2.3 RESULTS

Physical examinations indicated that 37 birds were clinically healthy. Sex identification results showed 12 females and 25 males. Not all parameters were determined for all nestlings due to a small blood sample collected. .

Tables 1 and 2 show the reference intervals for hematologic and biochemical values obtained from clinically healthy parrots, respectively. Table 3 and 4 shows mean values ( $\pm$  standard deviations) of the same parameters according to gender. It was not possible to calculate the RI for GGT because of the low number of samples ( $n=13$ ).

Significantly higher values ( $P<0.05$ ) of cholesterol were observed in females. No hemoparasites and no morphological differences were found in erythrocytes and leukocytes. No fecal parasites were found.

Tabela 1. Hematologic and total plasma protein reference intervals for healthy free-living Red-tailed Amazon parrots (*Amazona brasiliensis*) nestlings in Parana state, Brazil.

Parameter	SI Units	N	Means	SD	Median	Min	Max	RI*	Lower Ref Lim 90% CI	Upper Ref Lim 90% CI	Dist.†	Method‡
<b>RBC</b>	10 <sup>6</sup> /μL	37	1.8	0.4	1.8	1.16	2.5	1.1 – 2.6	0.9 – 1.2	2.4 – 2.7	G	S
<b>PCV</b>	%	37	39.7	5.2	38.0	32.0	49.0	29.1 – 50.3	26.8 – 31.4	47.8 – 52.7	G	ST
<b>Hemoglobin</b>	g/dL	36	10.1	1.4	10.0	7.3	13.5	7.2 – 12.9	6.6 – 7.9	12.3 – 13.6	NG	R
<b>MCV</b>	fL	37	223.0	34.0	217.0	167.9	310.9	152.0 – 293.0	137.0 – 168.0	277.0 – 309.0	G	S
(S)												
<b>MCHC</b>	g/dL	36	25.3	1.5	25.3	22.1	28.9	22.2 – 28.4	21.5 – 22.9	27.7 – 29.2	G	S
<b>WBCs</b>	10 <sup>3</sup> /μL	36	13.9	6.1	12.5	5.0	30.0	4.9 – 28.5	4.7 – 6.1	24.4 – 32.6	G	ST
<b>Heterophils</b>	%	35	47.0	16.5	47.0	13.0	74.0	9.6 – 77.7	2.3 – 17.4	69.5 – 85.5	NG	R
<b>Lymphocytes</b>	%	37	52.5	17.3	50.0	21.0	92.0	17.0 – 88.1	9.6 – 24.9	79.8 – 96.0	G	ST
<b>Monocytes</b>	%	34	1.9	1.6	2.0	0.0	6.0	0.0 – 6.0	0.0 – 0.0	5.0 – 6.0	G	ST
<b>Eosinophils</b>	%	36	1.7	1.4	2.0	0.0	5.0	0.0 – 5.0	0.0 – 0.0	4.0 – 5.0	G	ST
<b>Basophils</b>	%	35	1.7	1.8	1.0	0.0	7.0	0.0 – 7.0	0.0 – 0.0	5.4 – 7.0	G	ST
<b>Heterophils</b>	10 <sup>3</sup> /μL	35	6.1	3.8	6.1	1.4	17.0	1.2 – 16.0	0.7 – 1.8	13.1 – 18.9	G	ST
<b>Lymphocytes</b>	10 <sup>3</sup> /μL	36	7.2	4.0	6.0	2.4	18.4	2.4 – 18.7	2.0 – 2.9	14.5 – 23.7	G	ST
<b>Monocytes</b>	10 <sup>3</sup> /μL	34	0.3	0.3	0.2	0.0	1.0	0.0 – 1.0	0.0 – 0.0	0.7 – 1.0	G	ST
<b>Eosinophils</b>	10 <sup>3</sup> /μL	36	0.2	0.2	0.2	0.0	0.9	0.0 – 0.9	0.0 – 0.0	0.7 – 0.9	G	ST
<b>Basophils</b>	10 <sup>3</sup> /μL	35	0.2	0.3	0.1	0.0	1.7	0.0 – 1.3	0.0 – 0.0	0.8 – 1.7	G	ST
<b>H:L ratio</b>		36	0.9	0.6	0.9	0.0	2.0	0.0 – 2.2	0.0 – 0.0	1.9 – 2.4	G	ST
<b>TPP</b>	g/dL	37	2.9	0.4	3.0	2.2	3.6	2.1 – 3.7	2.0 – 2.3	3.5 – 3.8	G	S

SD, Standard Deviation; Min, Minimum; Max, Maximum; RI, Reference Interval; Ref Limit, Reference Limit; CI, Confidence Interval; RBC, red blood cells; PCV, packed cell volume; MCV, mean corpuscular volume; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; WBC, with blood cell; H:L, heterophil:lymphocyte; TPP, Total Plasma Protein. \*(S) indicates that suspected outliers were present and included. †G, Gaussian; NG, Non Gaussian.

‡Method: S, standard; R, robust; T, tranformed, data transformed to Gaussian prior to applying parametric or robust methods.

Table 2. Plasma biochemical reference intervals for healthy free-living Red-tailed Amazon parrots (*Amazona brasiliensis*) nestlings in Parana state, Brazil.

Parameter	SI Units	N	Means	SD	Med	Min	Max	RI*	Lower Ref Lim 90% CI	Upper Ref Lim 90% CI	Dist.†	Method‡
Uric acid	mg/dL	33	1.2	0.4	1.2	0.7	2.1	0.5 – 2.0 (R)	0.3 – 0.6	1.8 – 2.2	G	S
Glucose	mg/dL	34	234.6	24.1	231.1	193.0	297.4	184.9–284.3	173.4 – 197.5	271.6 – 297.1	G	S
AST	U/L	30	163.4	30.4	163.0	118.5	231.8	100.3-226.6	85.7 - 115.9	210.2 - 242.2	G	S
LDH	U/L	34	552.9	181.6	504.2	280.1	957.6	178.1-927.7	74.0 – 272.5	836.8 – 1016.1	G	S
CK	U/L	34	646.9	240.8	602.4	182.3	1133.8	149.8– 1144.0	26.1 – 262.9	1016.4 – 1276.6	G	S
Cholesterol	mg/dL	34	197.2	28.9	198.8	137.5	273.1	137.5 – 256.9 (S)	124.1 – 152.7	241.8 – 71.0	G	S
TP	g/dL	34	2.4	0.3	2.4	1.8	2.8	1.8 – 3.0	1.6 – 1.9	2.8 – 3.1	G	S
Albumin	g/dL	30	1.2	0.2	1.3	0.9	1.5	0.9 – 1.6 (R)	0.8 – 1.0	1.5 – 1.6	G	S
Globulin	g/dL	31	1.1	0.3	1.1	0.3	1.5	0.5 – 1.6	0.4 – 0.7	1.5 – 1.8	G	S
A/G ratio		29	1.1	0.2	1.0	0.67	1.75	0.7 – 1.7 (S)(R)	0.7 – 0.8	1.5 – 2.0	G	ST
Calcium	mg/dL	35	7.8	0.4	7.7	7.1	8.7	7.0 - 8.6	6.8 – 7.2	8.4 – 8.7	G	S
Phosphorus	mg/dL	35	4.5	0.7	4.3	3.2	5.9	2.9 – 6.1	2.6 – 3.3	5.7 – 6.4	G	S

SD, Standard Deviation; Med, Median; Min, Minimum; Max, Maximum; RI, Reference Interval; Ref Limit, Reference Limit; CI, Confidence Interval; Dist, Distribution; AST, aspartate aminotransferase; LDH, lactate deshydrogenase; CK, creatine kinase; TP, total protein; A/G, albumin/globulin.

\*(S) indicates that suspected outliers were present and included; (R) outliers were removed.

†G, Gaussian; NG, Non Gaussian.

‡Method: S, standard; T, transformed, data transformed to Gaussian prior to applying parametric or robust methods.

Table 3. Hematological and total plasma protein values (mean values, standard deviations and range) for free-living Red-tailed Amazon parrots (*Amazona brasiliensis*) nestlings according to sex, in Parana state, Brazil.

Parameter	Female (n = 12)		Male (n = 25)	
	Mean $\pm$ SD	Range	Mean $\pm$ SD	Range
<b>RBC (<math>10^6/\mu\text{L}</math>)</b>	1.8 $\pm$ 0.4	1.2 - 2.3	1.8 $\pm$ 0.4	1.4 – 2.5
<b>PCV (%)</b>	38.6 $\pm$ 4.6	32.0 - 49.0	40.2 $\pm$ 5.1	32.0 – 49.0
<b>Hemoglobin (g/dL)</b>	9.7 $\pm$ 1.3	8.5 - 12.1	10.3 $\pm$ 1.4	7.3 – 13.5
<b>MCV (fL)</b>	210.8 $\pm$ 35.0	160.9 - 280.4	225.0 $\pm$ 35.0	168.0 – 311.0
<b>MCHC (g/dL)</b>	25.3 $\pm$ 1.1	23.3 - 26.9	25.3 $\pm$ 1.7	22.1 – 28.9
<b>WBC (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	13.7 $\pm$ 4.3	9.0 - 24.0	14.4 $\pm$ 6.9	5.0 – 30.0
<b>Heterophils (%)</b>	44.1 $\pm$ 16.6	19.0 - 63.0	43.4 $\pm$ 16.8	13.0 – 74.0
<b>Lymphocytes (%)</b>	50.0 $\pm$ 15.9	31.0 - 75.0	53.8 $\pm$ 18.1	21.0 – 92.0
<b>Eosinophils (%)</b>	1.6 $\pm$ 1.8	0.0 – 5.0	1.7 $\pm$ 1.2	0.0 – 5.0
<b>Monocytes (%)</b>	2.3 $\pm$ 1.6	0.0 – 5.0	1.6 $\pm$ 1.6	0.0 – 6.0
<b>Basophils (%)</b>	1.7 $\pm$ 1.4	0.0 – 4.0	2.2 $\pm$ 2.2	0.0 – 7.0
<b>Heterophils (<math>10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	5.8 $\pm$ 2.1	1.7 – 9.0	6.9 $\pm$ 4.4	1.4 – 17.0
<b>Lymphocytes (<math>10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	7.1 $\pm$ 4.0	2.8 – 16.1	7.2 $\pm$ 4.1	2.4 – 18.5
<b>Eosinophils (<math>10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	0.2 $\pm$ 0.2	0.0 – 0.6	0.2 $\pm$ 0.3	0.0 – 0.9
<b>Monocytes (<math>10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	0.3 $\pm$ 0.2	0.0 – 0.5	0.2 $\pm$ 0.2	0.0 – 1.1
<b>Basophils (<math>10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	0.2 $\pm$ 0.1	0.0 – 0.4	0.3 $\pm$ 0.3	0.0 – 1.7
<b>H:L ratio</b>	1.1 $\pm$ 0.6	0.3 – 2.0	1.0 $\pm$ 0.8	0.0 – 3.5
<b>TPP (g/dL)</b>	3.0 $\pm$ 0.3	2.2 – 3.4	2.9 $\pm$ 0.4	2.2 – 3.6

SD, Standard Deviation; RBC, red blood cells; PCV, packed cell volume; MCV, mean corpuscular volume; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; WBC, with blood cell; H:L, heterophil:lymphocyte; TPP, Total Plasma Protein.

## 2.4 DISCUSSION

This is the first report of hematologic and biochemical reference intervals in free-living Red-tailed Amazon parrots nestlings in Parana state, Brazil.

RBC and PCV RIs for the nestlings were similar to values reported for the parrots *Amazona brasiliensis* (VAZ *et al.*, 2015), *A. vinacea* and *Pionopsitta pileata* (SCHMIDT *et al.*, 2009), *A. guildingii* (DEEM *et al.*, 2008), *Ecletus*



*roratus* (CLUBB *et al.*, 1990) and others psittacine birds such as *Anodorhynchus hyacinthinus* (KOLENISKOVAS *et al.*, 2012).

Table 4. Plasma biochemical values (mean values, standard deviations and range) for free-living Red-tailed Amazon parrots (*Amazona brasiliensis*) nestlings according to sex, in Parana state, Brazil.

Parameters	Female (n=12)		Male (n=25)	
	Means $\pm$ SD	Range	Means $\pm$ SD	Range
Uric acid (mg/dL)	1,29 $\pm$ 0,22	1,00 – 1,90	1,30 $\pm$ 0,43	0,70 – 2,40
Glucose (mg/dL)	232,02 $\pm$ 25,54	193,00 – 297,40	230,35 $\pm$ 21,29	174,70 – 276,60
AST (U/L)	151,42 $\pm$ 36,95	106,80 – 231,80	156,94 $\pm$ 28,30	112,70 – 221,50
LDH (U/L)	462,32 $\pm$ 163,56	195,10 – 868,10	527,99 $\pm$ 174,90	281,30 – 957,60
GGT (U/L)	3,99 $\pm$ 2,30	0,20 – 8,80	2,13 $\pm$ 1,95	0,1 – 7,1
CK (U/L)	583,17 $\pm$ 273,81	215,30 – 1133,80	581,76 $\pm$ 212,30	182,30 – 991,40
Cholesterol (mg/dL)	208,78 <sup>a</sup> $\pm$ 26,52	158,60 – 263,40	196,41 <sup>b</sup> $\pm$ 33,57	137,50 – 313,40
Total protein (g/dL)	2,43 $\pm$ 0,34	1,90 – 3,30	2,42 $\pm$ 0,41	1,80 – 3,50
Albumin (g/dL)	1,29 $\pm$ 0,22	1,00 – 1,90	1,29 $\pm$ 0,25	0,90 – 2,10
Globulin (g/dL)	1,12 $\pm$ 0,33	0,30 – 1,70	1,11 $\pm$ 0,33	0,20 – 1,80
A/G ratio				
Calcium (mg/dL)	7,81 $\pm$ 0,41	7,20 – 8,70	7,89 $\pm$ 0,48	7,10 – 9,10
Phosphorus (mg/dL)	4,41 $\pm$ 0,71	3,30 – 5,70	4,48 $\pm$ 0,68	3,20 – 5,9]

SD, Standard Deviation; AST, aspartate aminotransferase; LDH, lactate deshydrogenase; GGT, gamma glutamyltransferase; CK, creatine kinase; TPP, total plasma protein; A/G, albumin/globulin.

Means in the same line with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

Values observed for RBC and PCV parameters in *A. vinacea* and *P. pileata* (SCHMIDT *et al.*, 2009) differed between genders. Means reported for captive *A. guildingii* (DEEM *et al.*, 2008) and free-living Hyacinth macaw nestlings (*A. hyacinthinus*) in Brazilian Pantanal (ALLGAYER *et al.*, 2009) did not differ between genders. PCV tend to be higher in male compared to female birds. The reason for this could be a hormonal effect where estrogen depresses erythropoiesis, whereas androgens and thyroxin stimulate erythropoiesis (CAMPBELL, 2012a). PCV values decline during fasting, because erythropoiesis is dependent on nutritional state (ARTACHO *et al.*, 2007). Values reported in this study suggest that the nestlings were being fed properly.

Hemoglobin RI was similar to some values observed in young psittacines of *A. brasiliensis* (VAZ *et al.*, 2015), *E. roratus* and *Ara* sp. (CLUBB *et al.*, 1990, 1991), but lower than the values reported for adult parrots of *A. aestiva* (POLO *et al.*, 1998), *A. vinacea* (SCHMIDT *et al.*, 2009) and for *A. hyacinthinus* (KOLENISKOVAS *et al.*, 2012;). In some studies, young birds had lower hemoglobin concentrations when compared to adults, but in general, the hemoglobin does not appear to be affected by age (HARPER; LOWE, 1998). Hemoglobin is an iron-porphyrin-protein complex whose synthesis could be affected by poor nutrition (CAMPBELL, 2012a). Probably the parrots had a normal food intake.

Mean corpuscular volume and mean corpuscular hemoglobin RIs were similar to mean values found in Amazon parrots (CAMPBELL, 2010), Ecletus parrots (*E. roratus*) (CLUBB *et al.*, 1990), *Ara* sp. (CLUBB *et al.*, 1991) and *A. hyacinthinus* (ALLGAYER *et al.*, 2009; KOLENISKOVAS *et al.*, 2012).

These normal hematological findings suggest that the parrot population is well-nourished and the parents are finding sufficient sources of food in the EPA of Guaraqueçaba to feed the nestlings properly. PCV values reflect that the nestlings had an efficient oxygen carrying capacity (ARTACHO *et al.*, 2007). The absence of hemoparasites and fecal parasites could also indicate that is a healthy population.

The total WBC count RI was similar to mean values reported for *A. brasiliensis* (CAVALHEIRO, 1999), *A. aestiva* (DEEM *et al.*, 2005), *A. guildingii* (DEEM *et al.*, 2008), *A. vinacea* (SCHMIDT *et al.*, 2009), *Amazona* sp. (CAMPBELL, 2010), *E. roratus* (CLUBB *et al.*, 1990), *Cyanopsitta spixii* (FOLDENAUER *et al.*, 2007), *Ara* sp. (CLUBB *et al.*, 1991) and *A. hyacinthinus* (KOLENISKOVAS *et al.*, 2012). Changes in leukocyte morphology are important observations that permit assessment of the severity of the disease process (CAMPBELL, 2010). Values observed for the nestlings and the absence of morphologic abnormalities suggest that probably there were no potential pathologic processes occurring in the parrots and they had a suitable immune system status (ARTACHO *et al.*, 2007).

Heterophils were the second most numerous cells in the WBC count, as previously reported in psittacines (TELL; CITINO, 1992; POLLO *et al.*, 1998), although some studies have evidenced heterophils as the most numerous in *A.*

*brasiliensis* (CAVALHEIRO, 1999; VAZ *et al.*, 2015), *A. aestiva* (DEEM *et al.*, 2005) and *A. hyacinthinus* (ALLGAYER *et al.*, 2009). It could be considered as a species-specific feature (FUDGE, 2000; LATIMER; PRASSE, 2003). Possible explanations for the divergent observations in this study to another with the *A. brasiliensis* include stress of capture, handling, social interactions and environmental conditions (LATIMER; BIENZLE, 2010).

In general, most psittacine birds appear to exhibit a predominance of heterophils with a H:L ratio ranging between 1.1 and 2.4 (CAMPBELL, 2010). In this study, the H:L ratios were similar to ratios reported for other psittacine birds. The H:L ratio has been used as an index of stress in birds, and is now commonly used to assess the welfare of chickens and wild birds, evaluating the effect of transport, parasitic infections and radioactive contamination (DAVIS *et al.*, 2008). The H:L ratio measures a physiological change and is a good measure of bird's perception of stress in long-term changes in the environment (GROSS; SIEGEL, 1983). Heterophils and lymphocytes values were similar to those found for *A. vinacea* (SCHMIDT *et al.*, 2009), *E. roratus* nestlings (CLUBB *et al.*, 1990), *C. spixii* (FOLDENAUER *et al.*, 2007), free-living *A. hyacinthinus* nestlings (KARESH *et al.*, 1997) and *Ara* sp. nestlings (CLUBB *et al.*, 1991).

Percentage values of the reference intervals for eosinophils, monocytes and basophils were similar to the means reported to several captive or free-living psittacines, such as *A. brasiliensis* (CAVALHEIRO, 1999; VAZ *et al.*, 2015), *A. vinacea* (SCHMIDT *et al.*, 2009), *A. aestiva* (DEEM *et al.*, 2005), *Amazona* sp. (CAMPBELL, 2010), *E. roratus* (CLUBB *et al.*, 1990), *C. spixii* (FOLDENAUER *et al.*, 2007) and *A. hyacinthinus* (ALLGAYER *et al.*, 2009).

The exact functions of avian eosinophils are not known, and the responses of avian eosinophils to inflammation are variable and have not been reliably associated with a specific etiology (CAMPBELL, 2012a). Regarding to monocytes, there is a wide variety in reference values in healthy birds (MAXWELL, 1974). Basophils are usually uncommon in Amazon species, and range significantly between different bird species (TELL; CITINO, 1992; FUDGE; JOSEPH, 2000; DEEM *et al.*, 2008; ALLGAYER *et al.*, 2009).

TPP concentrations of the parrots were similar to values observed in psittacine birds, such as *A. aestiva* (DEEM *et al.*, 2005), *E. roratus* (CLUBB *et al.*, 1990), *Ara* sp. (CLUBB *et al.*, 1991; KARESH *et al.*, 1997) and *A.*

*hyacinthinus* (ALLGAYER *et al.*, 2009). These normal TPP values suggest that the animals are healthy, well-nourished and with normal protein production. Plasma proteins are important complementary constituents in the diagnosis of gastrointestinal, hepatic, renal or infectious diseases, helping the clinician to evaluate the nature, severity and progress of a disease (LUMEIJ, 2008). The normal plasma protein concentration is essential to the maintenance of the normal colloidal osmotic pressure, which preserves normal blood volume and pH (CAMPBELL, 2012b). Females generally have marked increase in TPP just before egg laying because of an estrogen-induced increase in the globulin fractions (GRIMINGER, 1976), but these were nestlings animals, and no difference between males and females was observed.

No significant differences in biochemical parameters were found between males and females. Cholesterol was the only parameter that was significantly different between genders. Deem *et al.* (2008) and Kolesniskovas *et al.* (2012) did not found significantly differences between genders for hematologic and biochemical parameters in 37 captive St Vincent Amazon parrots (*A. guildingii*) and in 29 Hyacinth macaws (*A. hyacinthinus*) apprehended from illegal wildlife trade, respectively.

Uric acid RIs observed for the *A. brasiliensis* nestlings were consistent to means reported for captive Amazon parrots (LUMEIJ; OVERDUIN, 1990; CAPITELLI; CROSTA, 2013), captive *A. guildingii* (DEEM *et al.*, 2008), young *E. roratus* parrots and young *Ara* sp macaws (CLUBB *et al.*, 1990, 1991). However, values were lower than the means observed in other studies with psittacine birds, such as free-living *A. aestiva* (DEEM *et al.*, 2005), captive *Psittacus erithacus* (LUMEIJ; OVERDUIN, 1990) and young captive *C. spixii* (FOLDENAUER *et al.*, 2007). Generally, juvenile birds have lower concentrations than adults (CLUBB *et al.*, 1990; 1991). Uric acid values may be influenced by amount of protein ingested with the feed, amount of ingested food, amino acid requirement for protein synthesis, water consumption and urine output (COSTA *et al.*, 1993). A blood uric acid concentration greater than 13 mg/dL is suggestive of impaired renal function (CAMPBELL, 2012b). The RI observed for the Red-tailed parrots suggest normal renal function.

The RI for blood glucose concentration found for the parrots was similar to values obtained for free-living and captive Amazon parrots (DEEM *et al.*,

2005, 2008; CAPITELLI; CROSTA, 2013) and others psittacine nestlings, such as *A. hyacinthinus* (ALLGAYER *et al.*, 2009), *E. roratus* and *Ara* sp. (CLUBB *et al.*, 1990, 1991). Reference values for plasma glucose in birds range somewhere between 200 to 450 mg/dL (LUMEIJ, 2008). Hypoglycemia results from prolonged starvation, severe liver disease, septicemia and endocrine disorders in the nestlings. Hyperglycemia occurs with glucocorticosteroid excess, such as occurs with stress or administration of corticosteroids (CAMPBELL, 2012b).

RI values for AST for the nestlings were consistent to means reported for captive adults Amazon parrots (LUMEIJ; OVERDUIN, 1990; DEEM *et al.*, 2008; CAPITELLI; CROSTA, 2013), captive *C. spixii* (FOLDENAUER *et al.*, 2007), young *E. roratus* and young *Ara* sp. (CLUBB *et al.*, 1990, 1991). In general, AST activities in birds greater than 230 UI/L are considered abnormal. High AST activity has been described in liver, skeletal muscle, heart, brain and kidney cells (HOCHLEITHNER, 1994). The RI observed in this study is within normal limits, suggesting the absence of liver abnormalities in the parrots.

The LDH RI for the *A. brasiliensis* nestlings was similar to means reported for captive *A. guildingii* (DEEM *et al.*, 2008), *E. roratus* and *Ara* sp. nestlings (CLUBB *et al.*, 1990; 1991). LDH enzymes occur in a wide variety of tissues, in particular skeletal muscle, cardiac muscle, liver, kidney, bone and red blood cells (HOCHLEITHNER, 1994). Elevated enzyme activity can be observed due to liver and muscle damage, but is nonspecific for hepatocellular disease in birds, and plasma LDH activity is less than 1000 UI/L in normal animals (HOCHLEITHNER, 1994; CAMPBELL, 2012b).

Plasma CK activity observed for the Red-tailed Amazon parrots was consistent to values reported for *E. roratus*, *Ara* spp. (CLUBB *et al.*, 1990, 1991) and *C. spixii* (FOLDENAUER *et al.*, 2007), but reaches higher values than those observed in Amazon parrots (LUMEIJ; OVERDUIN, 1990; CAPITELLI; CROSTA, 2013). CK activity may not be affected by age (CLUBB *et al.*, 1990, 1991). The normal CK activity in most species ranges from 100 a 500 UI/L (CAMPBELL, 2012b), and for the Red-tailed parrots the RI exceed these values. The birds in this study do not show apparent muscle injury, and this increase could be caused by muscular effort occurred in restraint for blood collection. Foldenauer *et al.* (2007) found CK values of 1088 U/L and 767 U/L in

captive *C. spixii* adults and nestlings, respectively. The authors suggest that high concentrations of CK may have been related to enzyme leakage from muscle trauma during capture and restraint of birds for sample collection. Extreme muscular activity in the period preceding blood sampling is an important cause of elevated enzyme activities in plasma (LUMEIJ, 2008). During capture and restraint some of the nestlings were quite stressed and this probably caused the increase in CK values.

Cholesterol concentration mean obtained for the Red-tailed parrots was similar to values observed in Amazon parrots (DEEM *et al.*, 2005, 2008; CAPITELLI; CROSTA, 2013). Females had significantly higher values than males. Hypercholesterolemia occurs during vitellogenesis in female birds preparing to lay eggs, but these were nestlings birds. Anyway, the normal plasma cholesterol concentrations of most species of birds range between 100 and 250 mg/dL and female mean is within this range (CAMPBELL, 2012b). Increases in cholesterol levels may be associated with hepatic and/or biliary disease (HOCHLEITHNER, 1994). The values obtained in this study suggest the absence of such abnormalities in nestlings.

Total protein values obtained by biuret method observed for the nestlings were consistent to means reported for *A. aestiva* (DEEM *et al.*, 2005), *Amazona* sp. (CAPITELLI; CROSTA, 2013), *P. pileata* (SCHMIDT *et al.*, 2009), *E. roratus* (CLUBB *et al.*, 1990), *A. hyacinthinus* (ALLGAYER *et al.*, 2009; KOLENISKOVAS *et al.*, 2012) and *Ara* sp. (CLUBB *et al.*, 1991). Lower values are reported for younger psittacine birds (CLUBB *et al.*, 1991; FOLDENAUER *et al.*, 2007). Total protein is often used as an indicator for the health status of a patient, and will be abnormal in infectious diseases that cause a stimulation of the immune system (HOCHLEITHNER, 1994).

Albumin, globulin and A/G ratio values were similar to means observed in psittacine birds. Deem *et al.* (2005) found values of 0,89 g/dL, 1,76 g/dL e 0,51, respectively, for free-living *A. aestiva* in Bolivia. Clubb *et al.* (1990) observed means of 1,3 g/dL, 1,5 g/dL e 0,9, respectively, for *E. roratus* nestlings. The normal A/G ratio for most psittacine birds is between 1.2 and 3.6 (CAMPBELL, 2012b), or between 1.6 and 4.5 (CRAY, 2000). Examples of disease with a decrease in the A/G ratio are chronic infectious diseases such as aspergillosis, psittacosis and tuberculosis (LUMEIJ, 2008). Plasma protein electrophoresis

was not available in our laboratory, and albumin was determined by the bromocresol green (BCG) dye-binding method. In general, albumin determinations performed with dry methods have not been validated for use in birds (LUMEIJ, 2008; CRAY *et al.*, 2011), but the BCG method has been used in psittacine birds (VALLE *et al.*, 2008). The albumin concentration of *Ara arauna* nestlings ranged between 1.5 and 1.7 g/dL using this technique (VALLE *et al.*, 2008)

The RIs for plasma calcium concentration and plasma phosphorus concentration were consistent to values found for *A. aestiva* (DEEM *et al.*, 2005), *A. guildingii* (DEEM *et al.*, 2008) and others Amazon parrots (LUMEIJ; OVERDUIN, 1990; CAPITELLI; CROSTA, 2013). Hypocalcemia has been associated with dietary calcium and vitamin D<sub>3</sub> deficiency, hypoalbuminemia, and alkalosis, and hypophosphatemia may occur with malabsorption and starvation (CAMPBELL, 2012b). The values observed suggest that the nestlings are well fed by the parents.

## 2.5 CONCLUSION

This is the first study to establish hematologic and biochemical RIs for free-living Red-tailed Amazon parrots (*A. brasiliensis*) nestlings, which was possible due to the large number of healthy individuals sampled.

The hematologic and biochemical parameters analyzed allowed to assess the physiologic and health status of a natural population of parrots. The results suggest that there are sufficient sources of food in the EPA of Guaraqueçaba to feed the parrots properly and the area is well preserved and provides suitable conditions for the reproduction of birds.

No significant differences in hematologic and biochemical parameters were found between males and females, except for cholesterol means, being higher in females.

Hematologic and biochemical parameters are important tools to establish health status of free-living birds, supporting conservation plans for endangered species, and are an important contribution to the clinical approach to wildlife management.

## REFERENCES

- ALLGAYER, M. C.; GUEDES N. M. R.; CHIMINAZZO, C.; CZIULIK, M.; WEIMER, T. A. Clinical pathology and parasitologic evaluation of free-living nestlings of the hyacinth macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, n. 4, p. 972–981, 2009.
- ARTACHO, P.; SOTO-GAMBOA, M.; VERDUGO, C.; NESPOLO, R. F. Using haematological parameters to infer the health and nutritional status of na endangered black-necked swan population. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 147, p. 1060-1066, 2007.
- ASVCP. 2011. **Guidelines for the determination of reference intervals (RI) in veterinary species and other related topics**. Available at: <http://www.asvcp.org/membersonly/ReferenceInterval.cfm>. Accessed March 7, 2015.
- CAMPBELL, T. W. Hematology of Birds. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Veterinary hematology and clinical chemistry**. 2 ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2012a, p. 238-276.
- CAMPBELL, T. W. Clinical Chemistry of birds. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Veterinary hematology and clinical chemistry**. 2 ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2012b, p. 582-598.
- CAMPBELL, T. W. Hematology of Psittacines. In: WEISS, D. J.; WARDROP, J. **Schalm's veterinary hematology**. 6 ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2010, p. 968–976.
- CAPITELLI, R.; CROSTA, L. Overview of Psittacine Blood Analysis and Comparative Retrospective Study of Clinical Diagnosis, Hematology and Blood Chemistry in Selected Psittacine Species. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 16, p. 71–120, 2013.
- CARRILO, A. C.; BATISTA, D. B. Conservação do papagaio-da-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) no estado do Paraná - uma experiência de educação ambiental no ensino formal. **Revista Árvore**, v. 31, n. 1, p. 113-122, 2007.
- CAVALHEIRO, M. L. **Qualidade do ambiente e características fisiológicas do papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) na Ilha Comprida – São Paulo**. Curitiba. 105 p. 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.
- CLUBB, S. L.; SCHUBOT, R. M.; JOYNER, K. Hematologic and serum biochemical reference intervals in juvenile macaws. **Journal of the Association of Avian Veterinarians**, v. 5, p. 158–161, 1991.
- CLUBB, S. L.; SCHUBOT, R. M.; JOYNER, K.; ZINKL, J. G.; WOLF, S.; ESCOBAR, J.; CLUBB, K. J.; KABBUR, M. B. Hematologic and serum



biochemical reference intervals in juvenile Eclectus parrots (*Eclectus roratus*). **Journal of the Association of Avian Veterinarian**, v. 4, p. 218-225, 1990.

COSTA, N. D.; MCDONALD, D. E.; SWAN, R. A. Age-related changes in plasma biochemical values of farmed Emus (*Dromaius novaehollandiae*). **Australian Veterinary Journal**, v. 70, p. 341-344, 1993.

CRAY, C.; WACK, A.; ARHEART, K. L. Invalid measurement of plasma albumin using bromocresol green methodology in penguins (*Spheniscus* species). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 25, n. 1, p. 14-22, 2011.

DAVIS, A. K.; MANEY, D. L.; MAERZ, J. C. The use of Leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review of ecologists. **Functional Ecology**, v. 22, p. 760-772, 2008.

DEEM, S. L.; LADWIG, E.; CRAY, C.; KARESH, W.B.; AMATO, G. Health assessment of the *ex situ* population of St Vincent parrots (*Amazona Guildingii*) in St Vincent and The Grenadines. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 22, n. 2, p.114–122, 2008.

DEEN, S. L.; NOSS, A. J.; CUELLAR, R. L.; KARESH, W. B. Health evaluation of free-ranging and captive blue-fronted amazon parrots (*Amazona aestiva*) in the Gran Chaco, Bolivia. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 36, n. 4, p. 598–605, 2005.

FOLDENAUER, U.; BORJAL, R. J.; DEB, A.; ARIF, A.; TAHA, A. S.; WATSON, R. W.; STEINMETZ, H.; BÜRKLE, M.; HAMMER, S. Hematologic and plasma biochemical values of Spix's macaw (*Cyanopsitta spixii*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 21, n. 4, p. 275-282, 2007.

FUDGE, A. M. Laboratory reference ranges for selected avian, mammalian, and reptilian species. In: FUDGE, A. M. **Laboratory medicine: avian and exotic pets**. Philadelphia, Pennsylvania: W. B. Saunders Co., 2000, p. 376–400.

FUDGE, A. M.; JOSEPH, V. Disorders of avian leukocytes. In: FUDGE, A. M. **Laboratory medicine: avian and exotic pets**. Philadelphia, Pennsylvania: W. B. Saunders Co., 2000, p.19-27.

GEFFRÉ, A.; CONCORDET, D.; BRAUN, J. P.; TRUMEL, C. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 1, p. 107–112, 2011.

GILARDI, K. V. K.; LOWENSTINE, L. J.; GILARDI, J. D.; MUNN, C. A. A survey for selected viral, chlamydial, and parasitic diseases in wild dusky-headed parakeets (*Aratinga weddellii*) and tui parakeets (*Brotogeris sanctithomae*) in Peru. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 31, n. 4, p. 523-528, 1995.

GRIFFITHS, R.; DOUBLE, M. C.; ORR, K.; DAWSON, R. J. G. A DNA test to sex most birds. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1071-1075, 1998.

GRIMINGER, P. Protein metabolism. In: STURKIE, P. D. **Avian Physiology** New York: Springer Verlag, 1976, p. 233-251.

GROSS, W. R.; SIEGEL, H. S. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. **Avian diseases**, v. 27, n. 4, p. 972-979, 1983.

HARPER, E. J.; LOWE, B. Hematology values in a colony of budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) and changes associated with aging. **American Society for Nutritional Sciences**, v. 128, p. 63-264, 1998.

HOCHLEITHNER, M. Biochemistries. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian Medicine: Principles and Application**. 1 ed. Lake Worth, Florida: Wingers Publishing, 1994, p. 223-245.

ICMBIO - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Plano de ação nacional para a conservação dos papagaios da Mata Atlântica. **Série espécies ameaçadas** nº 20. 2011;Brasília.

IUCN 2015. **IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3**. Disponível em: <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em: 25/03/2015.

KARESH, W. B.; DEL CAMPO, A.; BRASELTON, W. E.; PUCHE, H.; COOK, R. A. Health evaluation of free-ranging and hand-reared macaws (*Ara* spp.) in Peru. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 28, n. 4, p. 368-377, 1997.

KOLENISKOVAS, C. A. M.; NIEMEYER, C.; TEIXEIRA, R. H. F., NUNES, A. L. V.; RAMEH-DE-ALBUQUERQUE, L. C.; SANT'ANNA, S. S.; CATÃO-DIAS, J. L. Hematologic and plasma biochemical values of Hyacinth Macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 26, n. 3, p. 125-129, 2012.

LATIMER, K. S.; BIENZLE, D. Determination and interpretation of the avian leukogram. In: WEISS, D. J.; WARDROP, J. **Schalm's veterinary hematology**. 6 ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2010, p. 345-357.

LATIMER, K. S.; PRASSE, K. W. Leukocytes. In: LATIMER, K. S.; MAHAFFEY, E. A.; PRASSE, K. W. **Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology**. 4 ed. Ames, Iowa: Iowa State Press, 2003, p. 46-79.

LIMIÑANA R.; LÓPEZ-OLVERA J. R.; GALLARDO M.; FORDHAM M.; URIOS, V. Blood chemistry and hematologic values in free-living nestlings of Montagu's harriers (*Circus pygargus*) in a natural habitat. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 40, n. 4, p. 687-695, 2009.

LUMEIJ, J. T. Avian clinical biochemistry. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6 ed. San Diego: Academic Press, 2008, p. 839-872.

LUMEIJ, J. T.; OVERDUIN, L. M. Plasma chemistry references values in psittaciformes. **Avian Pathology**, v. 19., n. 2, p.235-244, 1990.

MASELLO, J. F.; QUILLFELDT, P. Are haematological parameters related to body condition, ornamentation and breeding success in wild burrowing parrots *Cyanoliseus patagonus*? **Journal of Avian Biology**, v. 35, p. 445-454, 2004.

MAXWELL, M. H. An ultrastructural comparison of the mononuclear leucocytes and thrombocytes in six species of domestic birds. **Journal of Anatomy**, v. 117, n. 1, p. 69-80, 1974.

MYIAKI, C. Y.; GRIFFITHS, R.; ORR, K.; NAHUM, L. A.; PEREIRA, S. L.; WAJNTAL, A. Sex identification of parrots, toucans, and curassows by PCR: perspectives for wild and captive population studies. **Zoo Biology**, v. 17, p. 415-423, 1998.

POLO, F. J.; PEINADO, V. I.; VISCOR, G.; PALOMEQUE, J. Hematologic and plasma chemistry values in captive psittacine birds. **Avian Diseases**, v. 42, p. 523-535, 1998.

SCHMIDT, E. M. S.; LANGE, R. R.; RIBAS, J. M.; DACIUK, B. M.; MONTIANI-FERREIRA, F.; PAULILLO, A. C. Hematology of the Red-capped parrot (*Pionopsitta pileata*) and Vinaceous Amazon parrot (*Amazona vinacea*) in captivity. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 40, n. 1, p. 15-17, 2009.

SNYDER, N. F. R.; MCGOWAN, P.; GILARDI, J.; GRAJAL, A. **Parrots—Status Survey and Conservation Action Plan**. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, Reino Unido, 1999.

SPVS - Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental. **Plano integrado de conservação para a região de Guaraqueçaba, Paraná, Brasil**. Vol. II. 1992; Curitiba.

SPVS – SOCIEDADE DE PESQUISA EM VIDA SELVAGEM E EDUCAÇÃO AMBIENTAL. 1999. Projeto saúde comunitária, educação e conservação para a região de Guaraqueçaba, Paraná, Brasil. **Relatório de atividades 1998**. Curitiba.

STONE, E. G.; MONTIEL-PARRA, G.; PEREZ, T. M. A survey of selected parasitic and viral pathogens in four species of mexican parrots, *Amazona autumnalis*, *Amazona oratrix*, *Amazona viridigenalis*, and *Rhynchopsitta pachyrhyncha*. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 36, n. 2, p. 245-249, 2005.

TELL, L. A.; CITINO, S. B. Hematologic and serum chemistry reference intervals for cuban Amazon parrots (*Amazona leucocephala leucocephala*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 23, n.1, p. 62-64, 1992.

VALLE, S. F.; ALLGAYER, M. C.; PEREIRA, R. A.; BARCELLOS, L. J. G.; HLAVAC, N. R. C.; FRANÇA, R. T.; LOCATELLI, M. L. Parâmetros de bioquímica sérica de machos, fêmeas e filhotes de araras-canindé (*Ara*

*ararauna*) saudáveis mantidas em cativeiro. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 711-716, 2008.

VAZ, F. F.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SIPINSKI, E. A. B.; ABBUD, M. C.; SEZERBAN, R. M.; SCHMIDT, E. M. S.; DITTRICH, J.; CAVALHEIRO, M. L. Hematologic and total plasma protein values obtained from free-living *Amazona brasiliensis* nestlings with different body weights in Parana state, Brazil. **Journal of Avian Medicine and Surgery**. In press 2015.

WILLIS, H. H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. **Medicine Journal of Australia**, v. 8, p. 375–376, 1921.

ZINKL, J. G. Avian hematology. In: JAIN N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 4 ed. Philadelphia, Pennsylvania: Lea and Febiger, 1986, 256–273.

### 3. CAPÍTULO 2. PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS EM FILHOTES DE PAPAGAIO-DE-CARA-ROXA (*Amazona brasiliensis*) SAUDÁVEIS E DOENTES DE VIDA LIVRE NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL

#### RESUMO

O papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) é uma espécie de psitacídeo ameaçada. Existem poucas informações sobre achados clínicos e parâmetros hematológicos e bioquímicos nesta espécie, sendo importante para o monitoramento da saúde da população de vida livre. O objetivo deste estudo foi determinar parâmetros hematológicos e bioquímicos em filhotes de *A. brasiliensis* de vida livre saudáveis e doentes, e comparar estes parâmetros entre grupos que apresentaram diferentes sinais clínicos com um grupo saudável clinicamente. Foi realizado exame físico e amostras de sangue foram coletadas de 68 papagaios na Área de Proteção Ambiental de Guaraqueçaba, estado do Paraná, sul do Brasil. Análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas. As médias dos grupos foram comparadas pelos testes *t* de Student e Mann-Whitney. O exame físico indicou que 37 aves estavam clinicamente saudáveis, 26 estavam com anormalidades discretas e 5 possuíam alterações graves, e os papagaios foram divididos em 7 grupos de acordo com os achados clínicos: exame normal (EN), presença de ectoparasitos (PE), alterações respiratórias (AR), presença de lesões antigas causadas por larvas de moscas (LL), presença de alterações no bico (AB), presença de alteração ocular e sinais clínicos graves (SCG). Valores significativamente inferiores ( $P < 0,05$ ) foram observados para hemoglobina nos grupos PE, AR, LL e AB, para CHCM nos grupos PE e AB, para glicose nos grupos LL e SCG, para LDH nos grupos PE, LL e AB e para CK nos grupos PE e LL. Médias significativamente superiores foram observadas para heterófilo absoluto no grupo SCG, para relação H:L nos grupos AR e SCG, para PPT nos grupos LL e AB, para proteína total no grupo LL, para globulina nos grupos LL e SCG, para cálcio nos grupos PE e LL e para fósforo no grupo SCG. De modo geral, a população encontrava-se em boas condições. Os resultados deste estudo podem servir como guia para alterações clínicas e sua associação com os

parâmetros hematológicos e bioquímicos que podem ser esperados em uma população de papagaios de vida livre. Os dados auxiliam planos de conservação e monitoramento da saúde do papagaio-de-cara-roxa, uma espécie de ave ameaçada.

**Palavras-chave:** hematologia aviária, bioquímica, heterofilia, clínica, Psittacidae.

## ABSTRACT

The red-tailed Amazon parrot (*Amazona brasiliensis*) is an endangered species of psittacine. There is little information about clinical findings and hematologic and biochemical parameters of this species, and it is important for monitoring the health of this population. The purpose of this study was to determine hematologic and biochemical parameters for free-living *A. brasiliensis* nestlings healthy and sick and compare these parameters between groups with different clinical findings. Sixty-eight parrots from the Environmental Protection Area of Guaraqueçaba were taken from the nest and physically restrained for clinical examination and blood collection. Hematologic and biochemical analysis were performed. Comparison between groups was analyzed using Mann-Whitney test or Student's *t* test. Physical examinations indicated that 37 birds were clinically healthy, 26 had mild abnormalities and 5 had severe disorders, and the parrots were split into 7 groups according to clinical findings: normal examination (NE), presence of ectoparasites (PE), respiratory disorders (RD), old skin lesions caused by flies' larvae (LL), beak disorders (BD), ocular disorders and severe clinical signs (SCS). Significantly lower values ( $P<0,05$ ) were observed for hemoglobin in PE, RD, LL and BD groups, for MCHC in PE and BD groups, for glucose in LL and SCS groups, for LDH in PE, LL and BD groups and for CK in PE and LL groups. Significantly higher means were observed for absolute heterophil in SCS group, for H:L ratio in RD and SCG groups, for TPP in LL and BD groups, for TP in LL group, for globulin in LL and SCS groups, for calcium in PE and LL groups and for phosphorus in SCS group. In general, the study population was in good conditions. The results provide a guide to the expected clinical findings

associated with hematologic and biochemical parameters in a population of free-living parrots. The data support conservation plans and health monitoring of the Red-tailed Amazon parrot, an endangered species of bird.

**Key words:** avian hematology, biochemical, heterophilia, clinic, Psittacidae

### 3.1 INTRODUÇÃO

Estudos de aves de vida livre têm se tornado importante nos últimos anos, principalmente quando envolvem manejo e conservação de espécies ameaçadas (FOLDENAUER *et al.*, 2007; LIMIÑANA *et al.*, 2009). O monitoramento da saúde nessas espécies deve ser realizado constantemente, pela crescente evidência de que certas enfermidades podem causar impactos adversos nessas populações (GILARDI *et al.*, 2005). Pesquisas envolvendo aves de vida livre são importantes também para sua conservação e estabelecimento de base de dados (GILARDI *et al.*, 1995; KARESH *et al.*, 1997; DEEM *et al.*, 2005; STONE *et al.*, 2005).

As técnicas para determinação de parâmetros hematológicos e bioquímicos são as mais fáceis e menos invasivas para avaliação fisiológica e do estado sanitário de uma população natural de vertebrados, e permite a detecção de alterações fisiológicas, patológicas, ecológicas e condições ambientais (ARTACHO *et al.*, 2007). Em aves selvagens, a hematologia é um dos procedimentos mais informativos para avaliar o perfil sanitário, as condições corporais e o estado nutricional (ARTACHO *et al.*, 2007).

Os papagaios são um importante e conveniente grupo de aves para o direcionamento de estudos, correspondendo à família com maior proporção (28%) de espécies ameaçadas (SNYDER *et al.*, 1999). Apesar disso, existem poucos estudos em aves de vida livre. Parâmetros hematológicos e bioquímicos têm sido determinados para espécies comuns de psitacídeos, mas são raros principalmente pela dificuldade de obtenção das amostras (MASELLO; LANZQUILLFELDT, 2004). Também raros são os estudos que incluem a resposta hematológica e bioquímica de papagaios frente a distúrbios clínicos (HAWKEY *et al.*, 1982; HAWKEY; HART, 1988; BRISCOE *et al.*, 2010).

O papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) é considerado uma espécie vulnerável de acordo com a *International Union for Conservation of Nature* (IUCN, 2015). É endêmico da floresta atlântica, habitando a região do litoral sul de São Paulo, do Paraná e litoral norte de Santa Catarina. Considerado uma espécie bioindicadora por sua sensibilidade as mudanças no ambiente, vem sofrendo declínio na sua população principalmente devido à destruição do seu habitat e captura de espécimes para o comércio ilegal (GALETTI *et al.*, 2006).

Desde 1997, a Sociedade de Pesquisas em Vida Selvagem e Educação Ambiental (SPVS) desenvolve o “Projeto de Conservação do Papagaio-de-cara-roxa”, numa tentativa de minimizar o declínio da população da espécie (ICMBio, 2011). Pela destruição do habitat dos papagaios e consequente ausência de ocos naturais suficientes para nidificação, a SPVS vem implantando ninhos artificiais de madeira e PVC em árvores nativas, os quais são amplamente utilizados pelas aves para reprodução.

O objetivo deste estudo foi determinar parâmetros hematológicos e bioquímicos em filhotes de *A. brasiliensis* de vida livre saudáveis e doentes, e comparar os grupos que apresentaram diferentes sinais clínicos com o grupo saudável clinicamente.

### **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi conduzido na ilha Rasa, localizada na Área de Proteção Ambiental (APA) de Guaraqueçaba, área de extensa e contínua floresta atlântica localizada no estado do Paraná, sul do Brasil (25° 15' e 25° 30' S e 48° 20' e 48° 30' O), constantemente monitorada pela SPVS (SPVS, 1992; CARRILO; BATISTA, 2007). A APA possui áreas com estuários, ilhas, manguezais, planície, montanhas e planalto, distribuídos em 314.000 hectares. (SPVS, 1992; CARRILO; BATISTA, 2007).

As coletas foram realizadas durante o período reprodutivo do papagaio-de-cara-roxa, concomitante ao monitoramento dos filhotes realizado pela SPVS. Foram realizadas de 16 de dezembro de 2013 a 31 de janeiro de 2014 em 5 expedições a campo. Os ninhos artificiais (feitos de madeira ou PVC) e naturais nas árvores foram alcançados através da técnica de rapel de



ascensão vertical em dossel. As aves foram retiradas dos ninhos, cuidadosamente examinadas e amostradas, e imediatamente foram recolocadas nos ninhos.

Um total de 68 filhotes foi avaliado. O exame físico foi realizado sob contenção física, realizando-se inspeção das mucosas e do corpo, a procura de ectoparasitos e possíveis ferimentos, auscultação da cavidade celomática utilizando estetoscópio, principalmente na região dos sacos aéreos, avaliação da hidratação, do estado nutricional (visualizando a musculatura peitoral) e palpação de membros em busca de possíveis fraturas. Os animais foram divididos em 7 grupos de acordo com os achados clínicos.

Amostras de sangue foram coletadas da veia ulnar superficial, previamente desinfetada com álcool 70%, utilizando-se seringas estéreis de 1mL com agulhas de insulina previamente heparinizadas, sendo o volume máximo coletado de 1 mL. Foram realizados dois esfregaços sanguíneos por amostra imediatamente após a coleta. As amostras foram inseridas em tubos e refrigeradas a 4°C em isopor contendo gelo no campo, e depois em geladeira. No dia seguinte às coletas, as amostras foram transportadas e processadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFPR, no prazo máximo de 24 horas. Todos os procedimentos foram realizados pelo mesmo veterinário, para controle de garantia de qualidade.

Parâmetros hematológicos incluíram contagem dos eritrócitos, hematócrito (Ht), concentração da hemoglobina (Hb), volume globular médio (VGM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de leucócitos, contagem diferencial de leucócitos e relação heterófilo:linfócito (H:L). As contagens dos eritrócitos e leucócitos foram realizadas em hemocítômetro (Câmara de Neubauer Improved®) com amostras de sangue diluídas a 1:100 em azul de cresil (ZINKL, 1986). O Ht foi determinado pela técnica do micro-hematócrito, utilizando-se a centrifugação do sangue em tubos capilares, a 9000 rotações por minuto durante 5 minutos. A concentração da Hb foi determinada pelo método da cianometahemoglobina (Labtest kit, Lagoa Santana, MG, Brazil), com leitura em espectrofotômetro (Mindray BA-88A) após a centrifugação dos lisados (ZINKL, 1986). Os índices hematimétricos VGM e CHCM foram calculados de acordo com fórmulas já estabelecidas. Foi utilizado corante Wright nas extensões sanguíneas para

avaliação das lâminas em microscópio óptico, e foi feita a contagem diferencial de 100 leucócitos, avaliados quanto a sua integridade, além de pesquisa de hemoparasitas. A relação H:L foi calculada pela divisão do número de heterofilos pelo número de linfócitos, obtidos através da contagem diferencial. Amostras de plasma obtidas após o hematócrito passaram por refratometria para determinação das concentrações da proteína plasmática total (PPT) (ZINKL, 1986).

O sangue foi centrifugado por cinco minutos para obtenção do plasma sanguíneo e determinação dos parâmetros bioquímicos. As análises bioquímicas foram realizadas em analisador automatizado BS-200 da Mindray®, utilizando kits Kovalent (Kovalent do Brasil Ltda - São Gonçalo - RJ). Foram determinados os valores para ácido úrico (método da uricase/peroxidase), gama glutamiltransferase (GGT) (método cinético-colorimétrico), aspartato aminotransferase (AST) (método cinético-UV), creatina quinase (CK) (método UV otimizado), lactato desidrogenase (LDH) (método cinético UV), proteínas totais (método do biureto), albumina (método do verde de bromo cresol), globulinas (calculadas reduzindo os níveis de albumina do valor das proteínas totais), relação albumina/globulina (calculada), colesterol (hidrólise enzimática e oxidação), glicose (glicose oxidase), cálcio (método fotométrico usando Arsenazo III) e fósforo (método fotométrico UV com determinação de ponto final).

A diferença entre os animais do grupo clinicamente saudável com os animais dos grupos com alterações clínicas foi analisada estatisticamente. Aqueles considerados com distribuição normal pelo teste Shapiro-Wilk foram analisados pelo teste t de *Student*, e aqueles considerados não paramétricos foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, utilizando o sistema de estatística "Action 2.6".

### 3.3 RESULTADOS

O exame físico indicou que 37 aves estavam clinicamente saudáveis, 26 estavam com anormalidades discretas e 5 possuíam alterações graves, como pode ser observado na Tabela 1.

Os grupos foram divididos de acordo com os achados clínicos, que foram exame normal (EN), presença de ectoparasitos (PE), alterações respiratórias (AR), presença de lesões antigas causadas por larvas de moscas (LL), presença de alterações no bico (AB), presença de alteração ocular e sinais clínicos graves (SCG). Doze filhotes tiveram mais de um achado clínico e foram incluídos em dois grupos. O animal que apresentava alteração ocular não foi incluído na estatística pelo *n* do grupo ser pequeno.

As aves com sinais clínicos graves estavam bastante apáticas. Duas estavam com intensa diarreia líquida e muito desidratadas (aves 1 e 2); uma estava com mucosas pálidas, caquética, desidratada e com fraqueza muscular (aves 3); uma apresentava estertores graves, caquexia e fraqueza muscular (ave 4); e por último, o filhote possuía o olho esquerdo perfurado e encontrava-se bastante prostrado, magro e fraco (ave 5).

Os filhotes foram monitorados nos ninhos pela SPVS até o final do período reprodutivo. Os filhotes 3 e 5 vieram a óbito antes de saírem dos ninhos, assim como um filhote do grupo LL e um do grupo EN.

A Tabela 2 mostra as médias ( $\pm$  desvios padrão) dos grupos para os parâmetros hematológicos e de proteína plasmática total. Os grupos com alterações clínicas foram comparados com o grupo EN. Valores significativamente inferiores ( $P < 0,05$ ) foram observados para hemoglobina nos grupos PE, AR, LL e AB. Os grupos PE e AB apresentaram valores inferiores para CHCM. Médias superiores para o valor absoluto de heterófilos foram observadas no grupo SCG e para a relação H:L nos grupos AR e SCG. Os grupos LL e AB apresentaram valores superiores para PPT.

Achados bastante discrepantes nos parâmetros hematológicos foram observados na ave 1, apresentando Ht de 55%; na ave 3, com contagem de eritrócitos de  $0,96 \times 10^6/\mu\text{L}$ , Ht de 25% e Hb de 5,6 mg/dL; ave 4 com 82% de heterófilos; e ave 5 com  $32,0 \times 10^3/\mu\text{L}$  de leucócitos totais. Foram detectados heterófilos tóxicos nas aves 3, 4 e 5.

Não houve lipemia ou hemólise nas amostras. Hemoparasitos não foram encontrados nos esfregaços sanguíneos.

Tabela 1. Achados clínicos de 68 filhotes de papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) de vida livre no estado do Paraná, Brasil.

<b>Achado clínico</b>	<b>Prevalência* n (%)</b>	<b>Comentários</b>
<b>Exame normal</b>	37 (54,4)	Sem anormalidades
<b>Presença de ectoparasitos</b>	13 (19,1)	Ácaros hematófagos e uma larva de mosca
<b>Alterações respiratórias</b>	09 (13,2)	Estertores discretos e moderados em sacos aéreos
<b>Lesões de larvas na pele</b>	09 (13,2)	Localizadas principalmente na região dorsal do corpo e na cabeça
<b>Alterações no bico</b>	06 (8,8)	Fraturas e desvios
<b>Sinais clínicos graves</b>	05 (7,3)	Aves muito apáticas
<b>Alteração ocular</b>	01 (1,5)	Edema periorbital

\*Doze filhotes tiveram mais de um achado clínico e foram inseridos em dois grupos.

A Tabela 3 mostra as médias ( $\pm$  desvios padrão) dos grupos para os parâmetros bioquímicos. Nem todos os parâmetros foram determinados para todos os filhotes devido a pouca quantidade de sangue coletado. Não foi possível comparar a média da GGT dos grupos AB e SCG por causa do *n* pequeno obtido. Valores significativamente inferiores ( $P < 0,05$ ) foram observados para glicose nos grupos LL e SCG. Os grupos PE, LL e AB apresentaram valores inferiores para LDH e os grupos PE e LL para CK. Médias superiores de proteína total foram obtidas no grupo LL e de globulina para os grupos LL e SCG. Os grupos PE e LL apresentaram médias superiores de cálcio e o grupo SCG de fósforo.

Tabela 2. Parâmetros hematológicos e de proteína plasmática total (médias e desvios padrão) para filhotes de papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) de vida livre de acordo com o achado clínico, no estado do Paraná, Brasil.

Parâmetro	EN (n = 37)	PE (n = 13)	AR (n=9)	LL (n=9)	AB (n=6)	SCG (n=5)
	Média±DP	Média±DP	Média±DP	Média±DP	Média±DP	Média±DP
Eritrócitos (10 <sup>6</sup> /μL)	1,82 ± 0,36	1,73 ± 0,27	1,79 ± 0,15	1,72 ± 0,19	1,68 ± 0,16	1,64 ± 0,53
Hematócrito (%)	39,68 ± 5,17	37,67 ± 4,91	36,22 ± 3,49	38,71 ± 2,87	35,80 ± 2,49	40,60 ± 11,26
Hemoglobina (g/dL)	10,09 ± 1,39	8,87* ± 1,12	9,04* ± 0,91	8,89* ± 0,64	8,08* ± 0,83	10,18 ± 2,95
VGM (fL)	222,80 ± 34,4	214,10 ± 21,00	203,90 ± 23,80	217,70 ± 22,60	212,30 ± 20,90	256,60 ± 55,00
CHCM (g/dL)	25,30 ± 1,53	23,24* ± 2,27	25,02 ± 2,00	22,45 ± 2,09	23,31* ± 1,00	24,96 ± 2,18
Leucócitos (x 10 <sup>3</sup> /μL)	13,92 ± 6,10	18,08 ± 9,71	12,78 ± 6,80	17,75 ± 9,48	16,33 ± 10,56	19,40 ± 10,99
Heterófilos (%)	43,63 ± 16,51	45,85 ± 17,02	51,00 ± 21,59	52,88 ± 17,50	44,17 ± 18,17	56,80 ± 22,04
Linfócitos (%)	52,54 ± 17,30	48,31 ± 19,17	43,22 ± 21,12	41,63 ± 17,05	50,50 ± 17,99	39,60 ± 22,30
Eosinófilos (%)	1,84 ± 1,57	2,15 ± 1,52	1,67 ± 1,66	1,75 ± 1,75	3,17 ± 1,72	1,00 ± 0,71
Monócitos (%)	1,68 ± 1,40	1,77 ± 1,36	2,33 ± 1,50	2,50 ± 1,31	1,17 ± 0,75	1,60 ± 1,52
Basófilos (%)	2,05 ± 2,01	1,15 ± 1,14	1,67 ± 1,58	1,25 ± 1,16	1,00 ± 1,55	1,00 ± 1,22
Heterófilos (10 <sup>6</sup> /L)	6,53 ± 3,82	7,04 ± 4,25	6,83 ± 5,45	8,50 ± 6,16	5,34 ± 3,06	12,84* ± 9,91
Linfócitos (10 <sup>6</sup> /L)	7,20 ± 4,01	7,44 ± 4,01	5,21 ± 4,66	6,47 ± 2,48	7,08 ± 2,73	5,84 ± 2,15
Eosinófilos (10 <sup>6</sup> /L)	0,26 ± 0,24	0,38 ± 0,33	0,16 ± 0,14	0,27 ± 0,35	0,53 ± 0,38	0,23 ± 0,18
Monócitos (10 <sup>6</sup> /L)	0,24 ± 0,24	0,30 ± 0,26	0,33 ± 0,29	0,43 ± 0,31	0,22 ± 0,25	0,39 ± 0,45
Basófilos (10 <sup>6</sup> /L)	0,29 ± 0,32	0,20 ± 0,29	0,23 ± 0,36	0,25 ± 0,37	0,20 ± 0,43	0,10 ± 0,10
Relação H:L	1,00 ± 0,73	1,23 ± 0,79	1,86* ± 1,79	1,72 ± 1,38	1,10 ± 0,79	2,38* ± 2,26
PPT (g/dL)	2,91 ± 0,37	2,97 ± 0,58	3,09 ± 0,38	3,29* ± 0,62	3,45* ± 0,57	3,16 ± 0,52

EN, exame normal; PE, presença de ectoparasitas; AR, alterações respiratórias; LL, lesões de larvas na pele; AB, alterações no bico; SCG, sinais clínicos graves; DP, desvio padrão; VGM, volume globular médio; CHCM, concentração da hemoglobina corpuscular média; H:L, heterófilo:linfócito; PPT, proteína plasmática total.

(\*) Diferente do grupo EN ( $P < 0.05$ ).

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos (médias e desvios padrão) para filhotes de papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) de vida livre de acordo com o achado clínico, no estado do Paraná, Brasil.

	EN (n = 37)	PE (n = 13)	AR (n=9)	LL (n=9)	AB (n=6)	SCG (n=5)
Parameter	Média±DP	Média±DP	Média±DP	Média±DP	Média±DP	Média±DP
Ácido úrico (mg/dL)	1,28±0,44	1,22±0,51	1,44±0,56	1,28±0,64	1,15±0,17	1,40±0,66
Glicose (mg/dL)	234,59±24,06	222,80±24,37	227,76±13,69	209,36*±16,14	213,78±23,38	199,18*±47,06
AST (U/L)	163,45±30,36	142,74±27,07	154,24±35,26	148,39±36,48	143,20±26,01	159,44±28,03
LDH (U/L)	552,92±181,58	411,75*±89,37	467,78±165,53	409,19*±71,64	349,70*±102,83	607,38±209,76
GGT (U/L)	2,57±2,71	2,95±2,17	1,87±1,46	3,96±2,66	-	-
CK (U/L)	646,92±240,83	413,88*±151,07	515,80±200,82	392,15*±131,69	549,60±217,27	643,40±454,35
Colesterol (mg/dL)	197,20±28,90	213,51±47,54	211,01±19,81	214,43±53,10	208,64±18,06	217,98±48,89
Proteína total (g/dL)	2,38±0,32	2,55±0,52	2,48±0,47	2,76*±0,58	2,60±0,30	2,66±0,63
Albumina (g/dL)	1,25±0,20	1,37±0,34	1,38±0,19	1,36±0,27	1,30±0,22	1,28±0,32
Globulina (g/dL)	1,08±0,27	1,18±0,48	1,10±0,37	1,40*±0,36	1,30±0,13	1,38*±0,49
Relação A/G	1,15±0,30	1,08±0,35	1,20±0,25	1,01±0,24	1,00±0,17	0,97±0,31
Cálcio (mg/dL)	7,77±0,38	8,20*±0,52	8,06±0,63	8,31*±0,65	8,06±0,27	7,54±0,48
Fósforo (mg/dL)	4,49±0,76	4,15±0,45	4,89±0,50	4,45±0,57	4,56±0,43	5,82*±2,17

EN, exame normal; PE, presença de ectoparasitas; AR, alterações respiratórias; LL, lesões de larvas na pele; AB, alterações no bico; SCG, sinais clínicos graves; DP, desvio padrão; AST, aspartato aminotransferase; LDH, lactato desidrogenase; GGT, gama glutamiltransferase; CK,creaqina quinase; A/G, albumina/globulina.

(\*) Diferente do grupo EN ( $P < 0.05$ ).

### 3.4 DISCUSSÃO

A maioria da população avaliada encontrava-se em boas condições de acordo com os exames físicos, sendo 54,4% (37/68) das aves saudáveis clinicamente, 38,2% (26/68) com alterações clínicas sutis e apenas 7,4% (5/68) apresentando sinais clínicos graves. Deem *et al.*, (2005) observaram 100% de aves clinicamente saudáveis entre 30 indivíduos de *Amazona aestiva* de vida livre na Bolívia. Já Deem *et al.* (2009) encontraram uma alta prevalência de anormalidades clínicas (81,1%) em 37 indivíduos cativos de *Amazona guildingii*, considerando pobre a saúde geral da população estudada. Provavelmente, as aves de cativeiro possuíam manejo e nutrição inadequados, e as alterações observadas poderiam ser facilmente prevenidas. Karesh *et al.* (1997) encontraram 14,3% (1/7) de filhotes de *Ara* sp. de vida livre com alterações clínicas, sendo que uma ave apresentava áreas aptéricas com crostas na porção ventral do abdômen. Gilardi *et al.* (1995) observaram 100% de 38 indivíduos de *Aratinga weddellii* e 13 de *Brotogeris sanctithomae* de vida livre sem lesões externas ou ectoparasitos, estando os animais em boas condições corporais. Ectoparasitos foram encontrados em filhotes de *A. brasiliensis* (CAVALHEIRO, 1999) de vida livre no litoral de São Paulo e em filhotes de *Amazona* sp. de vida livre no México (STONE *et al.*, 2005).

Os valores de Hb foram significativamente inferiores para os grupos PE, AR, LL e AB. A Hb é um complexo proteico que contém ferro e protoporfirinas, cuja síntese pode ser afetada por uma má nutrição (CAMPBELL, 2012a). A menor concentração de Hb apresentada pelos papagaios pode ser devido à diminuição no consumo de alimentos, causada provavelmente pela interferência dos sinais clínicos na ingestão dos mesmos. Os valores da CHCM foram inferiores nos grupos PE e AB, provavelmente por causa dos valores inferiores de Hb encontrados para estes dois grupos. A CHCM é útil na caracterização dos eritrócitos, especialmente na avaliação das anemias (CAMPBELL, 1994), mas no presente estudo o Ht de todos os grupos se manteve dentro de valores normais para psitacídeos (35 a 55%) (CAMPBELL, 2010).

O grupo SCG obteve valor de heterófilo absoluto significativamente superior ao grupo EN. Os heterófilos são primeira linha de defesa contra infecções e heterofilia frequentemente é observada em combinação com danos teciduais ou

infecção bacteriana, sendo células fagocíticas que participam de lesões inflamatórias (LATIMER; BIENZLE, 2010). Hawkey *et al.* (1982) encontraram heterofilia em 11 papagaios-do-congo (*Psittacus erithacus*) doentes por algum tipo de infecção, demonstrando a importância da resposta dos heterófilos frente a enfermidades. Clark *et al.* (2014) observaram leucocitose com predominância de heterofilia em 51,6% de 31 cacatuas naturalmente doentes ou com algum tipo de lesão, ilustrando também a heterofilia como resposta hematológica comum na inflamação. Da mesma forma, Hawkey e Hart (1988) encontraram heterofilia em 56% de 87 aves de diversas espécies com diagnóstico clínico de infecção bacteriana. Combinando a heterofilia encontrada com os achados clínicos, possivelmente as aves do grupo SCG estavam acometidas por algum tipo de infecção.

Heterófilos tóxicos encontrados nas aves 3, 4 e 5 do presente estudo foram classificados como +3, exibindo vacuolização e granulação anormal, indicada pela presença de grânulos grandes, redondos, pálidos e eosinofílicos e grânulos pequenos e intensamente basofílicos (CAMPBELL, 1994). Heterófilos tóxicos são incomuns e geralmente estão associados com doença inflamatória grave e toxemia bacteriana (SHINI *et al.*, 2008). Um dos filhotes apresentou menos que 25% de heterófilos tóxicos no esfregaço sanguíneo, e os outros dois apresentaram mais de 25%. Números discretos de heterófilos tóxicos podem estar presentes nos estágios iniciais das doenças, e este número pode crescer conforme a doença se agrava (CAMPBELL, 1994). Jaensch e Clark (2004) analisaram características hematológicas em resposta a inflamação ou lesões traumáticas em 28 cacatuas de vida livre, encontrando alterações tóxicas em heterófilos de 10,7% (3/28) das amostras. As alterações tóxicas morfológicas incluíam hipogranulação, vacuolização citoplasmática, basofilia citoplasmática e edema celular. Dois destes animais possuíam discreta heterofilia. Clark *et al.* (2014) observaram heterófilos morfológicamente atípicos em 87,1% de 31 casos de cacatuas doentes, incluindo basofilia citoplasmática, vacuolização citoplasmática, presença de grânulos grandes, redondos e basofílicos. Além da heterofilia, os heterófilos tóxicos encontrados nos filhotes do grupo SCG sugerem também acometimento por doença sistêmica grave e poderiam indicar um prognóstico desfavorável, confirmado pelo óbito dos filhotes 3 e 5.



A relação H:L foi superior nos grupos AR e SCG. As aves do grupo AR demonstraram bastante estresse na contenção, estavam ofegantes e possuíam estertores em sacos aéreos. Os filhotes do grupo SCG estavam bastante apáticos, com estado geral ruim, magros e aparentemente com dor. Estes fatores estressantes em ambos os grupos podem explicar a alta relação H:L observada, junto com a heterofilia obtida no grupo SCG. Liberação crônica de glicocorticoides causados por estresse podem levar a diminuição do número de linfócitos circulantes e aumento no número de heterófilos circulantes (DAVIS *et al.*, 2008). A relação H:L tem sido utilizada como um indicador de estresse em aves (GROSS *et al.*, 1980; SCOPE *et al.*, 2002), e é frequentemente aplicada na avaliação de bem-estar em frangos e aves selvagens, estimando efeitos de transporte, infecções parasitárias e contaminação radiotativa (DAVIS *et al.*, 2008). Apesar da diferença estatística dos grupos na relação H:L, os valores encontram-se dentro da amplitude considerada normal para psitacídeos (1,1 a 2,4) (CAMPBELL, 2010).

Valores superiores de PPT foram obtidos nos grupos LL e AB e de proteína total no grupo LL. Hiperproteinemia é indicada por concentrações que excedam 4,5 g/dL na maioria das aves e geralmente resulta de desidratação, inflamação crônica ou aguda (CAMPBELL, 2012b). O Ht das aves está dentro de valores normais encontrados para psitacídeos, sugerindo ausência de desidratação. O grupo LL apresentou valores superiores de globulinas, como pode ser visto na Tabela 3, e isso pode ter ocasionado aumento da concentração das proteínas. De qualquer maneira, as medias observadas em ambos os grupos estão abaixo de 4,5 g/dL e podem não ser achados preocupantes.

Médias da concentração de glicose significativamente inferiores foram observadas para os grupos LL e SCG. Geralmente, a concentração sanguínea de glicose em aves normais varia de 200-500 mg/dL (LUMEIJ 2008). Hipoglicemia poderia indicar jejum prolongado, doença hepática grave, má absorção, septicemia e até desordens endócrinas nos filhotes. (CAPITELLI; CROSTA, 2013). Os dois grupos atingiram valores inferiores aos considerados normais. Estes achados podem estar associados à diminuição na ingestão de alimentos, principalmente dos filhotes do grupo SCG, que já demonstravam fraqueza e caquexia.

Valores significativamente inferiores de LDH foram encontrados nos grupos PE, LL e AB. A atividade plasmática de LDH é considerada normal em aves até

1000 UI/L (CAMPBELL, 2012b). As isoenzimas de LDH são encontradas na maioria dos tecidos das aves, não sendo específica para doenças hepatocelulares, mas aumento na atividade de LDH pode estar associado com hepatopatias e dano muscular (CAPITELLI; CROSTA, 2013). Já as causas da diminuição de LDH são consideradas não significativas em mamíferos (WILARD; TWEDT, 2004) e em pombas (*Columba livia domestica*) (SCOPE *et al.*, 2002). De qualquer forma, as concentrações desta enzima encontradas nos três grupos estão dentro da normalidade e podem não ser um achado preocupante para os filhotes.

Os grupos PE e LL apresentaram valores significativamente inferiores de CK com relação ao grupo EN. Geralmente, a atividade plasmática normal em aves varia de 100 a 500 UI/L, sendo que nos papagaios-de-cara-roxa o IR superou estes valores (CAMPBELL, 2012b). Foldenauer *et al.* (2007) encontraram valores de CK de até 1088 U/L e 767 U/L em adultos e filhotes de *C. spixii* cativas, respectivamente. Segundo os autores, o aumento ocorreu devido à liberação da enzima no trauma muscular provocado durante a captura e contenção das aves para coleta de amostra. Atividade muscular extrema no período precedente à coleta de sangue é uma importante causa de aumento de CK plasmático (LUMEIJ, 2008). O aumento observado nos filhotes deste estudo pode ser proveniente do esforço muscular ocorrido na captura e contenção antes e durante a coleta de sangue. A atividade de CK está sujeita a inúmeras variações fisiológicas, como massa muscular do indivíduo, gênero, idade e atividade física (HOCHLEITHNER, 1994), e variações nesses fatores podem explicar a diferença significativa encontrada nos grupos PE e LL.

Os valores de globulina obtidos nos grupos LL e SCG foram significativamente superiores em relação ao grupo EN. Aumento nos valores de globulina pode ser causado por inflamação aguda ou crônica, pela elevação das frações  $\alpha$  e  $\beta$  globulinas (incluindo fibrinogênio), consideradas proteínas de fase aguda, e das frações  $\gamma$  em condições crônicas (incluindo imunoglobulinas) (LUMEIJ, 2008). O grupo LL apresentou valores estatisticamente superiores para proteína total e globulina, causando uma discreta redução na relação A/G. Estes achados são frequentemente associados com doenças inflamatórias crônicas em aves (CAMPBELL, 2012b). Briscoe *et al.* (2010) encontraram valores de globulina elevados em 17,4% de 144 psitacídeos de estimação doentes por meio da

eletroforese. Valores superiores de globulina do grupo SCG combinados com os achados hematológicos podem reforçar a sugestão de doença sistêmica e inflamatória grave nos filhotes.

Valores superiores para concentração de cálcio plasmático foram encontrados nos grupos PE e LL, e para concentração de fósforo no grupo SCG. Um terço à metade do cálcio plasmático está ligado à albumina, sendo a concentração do cálcio influencia pelos níveis dessa proteína (CAPITELLI; CROSTA, 2013). Porém, ambos os grupos não apresentaram médias superiores para albumina em relação ao grupo EN. Hipercalcemia pode estar associada também com hiperparatireoidismo primário, tumores esqueléticos, excesso de cálcio e vitamina D<sub>3</sub> na dieta (LUMEIJ, 1994). Hiperfosfatemia pode estar ligada à doença renal grave, excesso de fósforo na dieta e hipervitaminose D<sub>3</sub> (CAMPBELL, 2012b). Os valores de ácido úrico do grupo SCG sugerem ausência de lesão renal grave, e por serem aves de vida livre, provavelmente não possuem excesso de fósforo e vitaminas na dieta. Apesar dos valores estatisticamente diferentes, hipercalcemia nas aves está associada a concentrações de cálcio maiores que 11 mg/dL e hiperfosfatemia a concentrações de fósforo maiores que 8 mg/dL (CAPITELLI; CROSTA, 2013). Portanto, a diferença estatística observada pode ser resultado de variações fisiológicas que podem ocorrer nos filhotes.

### **3.5 CONCLUSÃO**

Neste estudo, foram determinados parâmetros hematológicos e bioquímicos em 68 filhotes de papagaio-de-cara-roxa clinicamente saudáveis e doentes de vida livre no estado do Paraná, sendo estes parâmetros comparados entre grupos com diferentes sinais clínicos e um grupo clinicamente saudável. O estudo ilustra uma variedade de respostas hematológicas e bioquímicas frente à ocorrência natural de alterações clínicas em uma população de papagaios de vida livre.

Mais da metade da população (37/68) estudada encontrava-se em boas condições de acordo com os exames físicos, sendo que um grupo (26/68) apresentava anormalidades clínicas sutis e uma pequena parcela (5/68) manifestava sinais clínicos graves. Os grupos foram divididos em exame normal (EN), presença de ectoparasitos (PE), alterações respiratórias (AR), presença de lesões antigas

causadas por larvas de moscas (LL), presença de alterações no bico (AB), presença de alteração ocular e sinais clínicos graves (SCG).

Diferenças hematológicas significativas foram encontradas em todos os grupos. Valores inferiores de Hb foram observados nos grupos PE, AR, LL e AB; valores inferiores de MCHC nos grupos PE e AB; valores superiores de heterófilos absolutos no grupo SCG; valores superiores da relação H:L para os grupos AR e SCG; valores superiores de PPT nos grupos LL e AB.

Nos parâmetros bioquímicos, foram observados valores inferiores de glicose nos grupos LL e SCG; valores inferiores de LDH nos grupos PE, LL e AB; valores inferiores de CK para os grupos PE e LL; valores superiores de proteína total para o grupo LL; valores superiores de globulina para os grupos LL e SCG; valores superiores de cálcio nos grupos PE e LL; e valores superiores de fósforo no grupo SCG. As diferenças para os parâmetros LDH, CK, cálcio e fósforo não tiveram significado relevante, estando relacionada a variações fisiológicas dos indivíduos.

Os resultados deste estudo podem servir como guia para alterações clínicas e sua associação com os parâmetros hematológicos e bioquímicos que podem ser esperados em uma população de papagaios de vida livre, podendo ser extrapoladas para aves de cativeiro. O banco de dados gerado é importante para auxiliar planos de conservação e monitorar a saúde do papagaio-de-cara-roxa, uma espécie de ave ameaçada.

## REFERÊNCIAS

ARTACHO, P.; SOTO-GAMBOA, M.; VERDUGO, C.; NESPOLO, R. F. Using haematological parameters to infer the health and nutritional status of an endangered black-necked swan population. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 147, p. 1060-1066, 2007.

BRISCOE, J. A.; ROSENTHAL, K. L.; SHOFER, F. S. Select complete blood cell count and plasma protein electrophoresis parameters in pet psittacine birds evaluated for illness. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 24, n. 2, p. 131-137, 2010.

CAMPBELL, T. W. Hematology. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian Medicine: Principles and Application**. 1 ed. Lake Worth, Florida: Wingers Publishing, 1994, p. 178-198.

CAMPBELL, T. W. Hematology of Birds. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Veterinary hematology and clinical chemistry**. 2 ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2012a, p. 238-276.

CAMPBELL, T. W. Clinical Chemistry of birds. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Veterinary hematology and clinical chemistry**. 2 ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2012b, p. 582-598.

CAMPBELL, T. W. Hematology of Psittacines. In: WEISS, D. J.; WARDROP, J. **Schalm's veterinary hematology**. 6 ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2010, p. 968–976.

CAPITELLI, R.; CROSTA, L. Overview of Psittacine Blood Analysis and Comparative Retrospective Study of Clinical Diagnosis, Hematology and Blood Chemistry in Selected Psittacine Species. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 16, p. 71–120, 2013.

CARRILO, A. C.; BATISTA, D. B. Conservação do papagaio-da-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) no estado do Paraná - uma experiência de educação ambiental no ensino formal. **Revista Árvore**, v. 31, n. 1, p. 113-122, 2007.

CAVALHEIRO, M. L. **Qualidade do ambiente e características fisiológicas do papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) na Ilha Comprida – São Paulo**. Curitiba. 105 p. 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

CLARK, P.; BOARDMAN, W. S. J.; RAIDAL, S. R. Haematological characteristics of individuals from nine species of Australian cockatoos in response to naturally occurring disease and injury. **Comparative Clinical Pathology**, v. 23, p. 1225-1232, 2014.

DAVIS, A. K.; MANEY, D. L.; MAERZ, J. C. The use of Leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review of ecologists. **Functional Ecology**, v. 22, p. 760-772, 2008.

DEEM, S. L.; LADWIG, E.; CRAY, C.; KARESH, W.B.; AMATO, G. Health assessment of the *ex situ* population of St Vincent parrots (*Amazona Guildingii*) in St Vincent and The Grenadines. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 22, n. 2, p.114–122, 2008.

DEEN, S. L.; NOSS, A. J.; CUELLAR, R. L.; KARESH, W. B. Health evaluation of free-ranging and captive blue-fronted amazon parrots (*Amazona aestiva*) in the Gran Chaco, Bolivia. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 36, n. 4, p. 598–605, 2005.

FOLDENAUER, U.; BORJAL, R. J.; DEB, A.; ARIF, A.; TAHA, A. S.; WATSON, R. W.; STEINMETZ, H.; BÜRKLE, M.; HAMMER, S. Hematologic and plasma biochemical values of Spix's macaw (*Cyanopsitta spixii*). **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 21, n. 4, p. 275-282, 2007.

GALETTI, M.; SHUNCK, F.; RIBEIRO, M.; PAIVA, A. A.; TOLETO, A.; DONSECA, L. Distribuição e tamanho populacional do papagaio-de-cara-roxa *Amazona brasiliensis* no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 14, n. 3, p. 239-247, 2006.

GILARDI, K. V. K.; LOWENSTINE, L. J.; GILARDI, J. D.; MUNN, C. A. A survey for selected viral, chlamydial, and parasitic diseases in wild dusky-headed parakeets (*Aratinga weddellii*) and tui parakeets (*Brotogeris sanctithomae*) in Peru. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 31, n. 4, p. 523-528, 1995.

GROSS, W. R.; SIEGEL, H. S. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. **Avian diseases**, v. 27, n. 4, p. 972-979, 1983.

HAWKEY, C.; HART, M. G. An analysis of the incidence of hyperfibrinogenaemia in birds with bacterial infections. **Avian Pathology**, v. 17, p. 427-432, 1988.

HAWKEY, C.; HART, M. G.; KNIGHT, J. A.; SAMOUR, J. H.; JONES, D. M. Haematological findings in healthy and sick African grey parrots (*Psittacus erithacus*). **The Veterinary Record**, v. 111, p. 580-582, 1982

HOCHLEITHNER, M. Biochemistries. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian Medicine: Principles and Application**. 1 ed. Lake Worth, Florida: Wingers Publishing, 1994, p. 223-245.

ICMBIO - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Plano de ação nacional para a conservação dos papagaios da Mata Atlântica. **Série espécies ameaçadas** nº 20. 2011;Brasília.

IUCN 2015. **IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3**. Disponível em: <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em: 26/03/2015.

JAENSCH, S.; CLARK, P. Haematological characteristics of response to inflammation or traumatic injury in two species of black cockatoos: *Calyptorhynchus magnificus* and *C. funereus*. **Comparative Clinical Pathology**, v. 13, p. 9-13, 2004.

KARESH, W. B.; DEL CAMPO, A.; BRASELTON, W. E.; PUCHE, H.; COOK, R. A. Health evaluation of free-ranging and hand-reared macaws (*Ara* spp.) in Peru. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 28, n. 4, p. 368-377, 1997.

LATIMER, K. S.; BIENZLE, D. Determination and interpretation of the avian leukogram. In: WEISS, D. J.; WARDROP, J. **Schalm's veterinary hematology**. 6 ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2010, p. 345-357.

LIMIÑANA R.; LÓPEZ-OLVERA J. R.; GALLARDO M.; FORDHAM M.; URIOS, V. Blood chemistry and hematologic values in free-living nestlings of Montagu's harriers (*Circus pygargus*) in a natural habitat. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 40, n. 4, p. 687-695, 2009.

LUMEIJ, J. T. Avian clinical biochemistry. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6 ed. San Diego: Academic Press, 2008, p. 839-872.

LUMEIJ, J. T. Endocrinology. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. **Avian Medicine: Principles and Application**. 1 ed. Lake Worth, Florida: Wingers Publishing, 1994, p. 582-606.

MASELLO, J. F.; QUILLFELDT, P. Are haematological parameters related to body condition, ornamentation and breeding success in wild burrowing parrots *Cyanoliseus patagonus*? **Journal of Avian Biology**, v. 35, p. 445-454, 2004.

SCOPE, A.; FILIP, T.; GABLER, C.; RESCH, F. The influence of stress from transport and handling on hematologic and clinical chemistry blood parameters of racing pigeons (*Columba livia domestica*). **Avian Diseases**, v. 46, p. 224-229, 2002.

SHINI, S.; KAISER, P.; SHINI, A.; BRYDEN, W. L. Differential alterations in ultrastructural morphology of chicken heterophils and lymphocytes induced by corticosterone and lipopolysaccharide. **Veterinary Immunology and immunopathology**, v. 122, p. 83-93, 2008.

SNYDER, N. F. R.; MCGOWAN, P.; GILARDI, J.; GRAJAL, A. **Parrots—Status Survey and Conservation Action Plan**. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, Reino Unido, 1999.

STONE, E. G.; MONTIEL-PARRA, G.; PEREZ, T. M. A survey of selected parasitic and viral pathogens in four species of mexican parrots, *Amazona autumnalis*, *Amazona oratrix*, *Amazona viridigenalis*, and *Rhynchopsitta pachyrhyncha*. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 36, n. 2, p. 245-249, 2005.

ZINKL, J. G. Avian hematology. In: JAIN N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 4 ed. Philadelphia, Pennsylvania: Lea and Febiger, 1986, 256–273.

WILLARD, M. D.; TWEDT, T. C. Gastrointestinal, pancreatic, and hepatic disorders. In: WILLARD, M. D.; TVEDTEN, H. **Small animal clinical diagnosis by laboratory methods**. 4 ed. St. Louis, Missouri: Saunders, Elsevier, 2004, p. 208-246.

#### 4. CAPÍTULO 3. PESQUISA DE ENTEROBACTÉRIAS E AGENTES INFECCIOSOS EM FILHOTES DE PAPAGAIO-DE-CARA-ROXA (*Amazona brasiliensis*) DE VIDA LIVRE NO PARANÁ

##### RESUMO

O papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) é uma espécie de psitacídeo ameaçada. O monitoramento da saúde de espécies ameaçadas de vida livre deve ser encorajado pela crescente evidência de que certas enfermidades podem causar impactos adversos em populações de aves. O objetivo deste estudo foi avaliar a saúde de filhotes de *A. brasiliensis* de vida livre na Área de Proteção Ambiental de Guaraqueçaba, estado do Paraná, sul do Brasil, por meio de pesquisa de anticorpos e de patógenos, e da determinação da microbiota desses papagaios, comparando-a entre aves provenientes de ninhos artificiais feitos de madeira e PVC. Amostras de sangue foram coletadas de 64 indivíduos para pesquisa de anticorpos para *Chlamydophila psittaci* pelo teste de ELISA modificado. Para análise microbiológica, amostras de swab cloacal e de orofaringe foram coletadas de 23 aves provenientes de ninhos de madeira e de 15 aves provenientes de ninhos de PVC. Para pesquisa de *C. psittaci* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional foram coletadas amostras de cloaca e orofaringe de 58 indivíduos. Para detecção do vírus da influenza aviária, paramyxovirus-1, paramyxovirus-2 e vírus da febre do oeste do Nilo por meio da PCR em tempo real foram coletadas amostras de 50 filhotes. A comparação entre os ninhos foi realizada com teste de normalidade Shapiro-Wilk e análise de variância (ANOVA) com 5% de confiança. Foram isoladas 125 colônias bacterianas com identificação de 19 espécies e três gêneros de bactérias, sendo 98,4% de amostras positivas para enterobactérias. As espécies com maior prevalência de isolamento foram *Escherichia coli* (70,73%), *Klebsiella oxytoca* (39,13%), *Klebsiella pneumoniae* (30,43%) e *Enterobacter aerogenes* (30,43%). *Salmonella enteritidis* foi detectada em três amostras dos filhotes e *Salmonella* spp. em apenas duas. A microbiota dos papagaios não diferiu em relação ao tipo de ninho. Todas as amostras para pesquisa de patógenos e anticorpos foram negativas. A avaliação da saúde de filhotes de *A. brasiliensis* *in situ* deste estudo possibilitou a obtenção de dados ainda não descritos para a espécie, fornecendo



informações da saúde atual de uma população selecionada e um ponto de referência para futuras avaliações e interpretações de resultados laboratoriais, contribuindo com planos de conservação.

**Palavras-chave:** Psittacidae, microbiologia, *Chlamydophila psittaci*, influenza aviária, doença de NewCastle, Febre do Oeste do Nilo.

## ABSTRACT

The Red-tailed Amazon parrot (*Amazona brasiliensis*) is an endangered species of psittacine. Health monitoring in free-living species needs to be encouraged in light of increasing evidence that disease has an adverse impact on avian populations. The purpose of this study was to evaluate the health of free-living *A. brasiliensis* nestlings in Environmental Protection Area of Guaraqueçaba, Parana state, southern Brazil, for detection of antibodies and pathogens, and determine the microflora of these parrots, comparing two types of artificial nests (made of wood or PVC). Blood samples were collected from 64 birds and evaluated for antibodies to *Chlamydophila psittaci* by modified ELISA test. For microbiological analysis, cloacal and oropharyngeal swabs samples were collected from 23 birds from wooden nests and from 13 birds from PVC nests. To detect *C. psittaci* by conventional polymerase chain reaction (PCR), swab samples of cloaca and oropharynxes were collected from 58 individuals. To detect avian influenza virus, paramyxovirus-1, paramyxovirus-2 and west nile virus by real-time PCR, samples were collected from 50 nestlings. The comparison between the nests was performed by analysis of variance (ANOVA) ( $P \leq 0.05$ ). 125 bacterial colonies were isolated and 19 species and 3 genera were identified. 98.4% of the samples were positive for enterobacteria. The species with the highest prevalence were *Escherichia coli* (70.73%), *Klebsiella oxytoca* (39.13%), *Klebsiella pneumoniae* (30.43%) and *Enterobacter aerogenes* (30.43%). *Salmonella enteritidis* was detected in three samples and *Salmonella* sp. in two samples. The microbiota of parrots did not differ between the types of nest. All samples tested by ELISA and PCR were negative. The evaluation of the health of *A. brasiliensis* parrots in situ allowed obtaining data not yet described for this species, providing information of the current health of a selected population and a reference point for future

assessments and interpretations of laboratory results, contributing to the conservation plans.

**Key words:** Psittacidae, microbiology, *Chlamydophila psittaci*, avian influenza, NewCastle disease, West Nile fever.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

Atualmente, há maior necessidade de pesquisas em populações de aves ameaçadas ou em perigo de extinção (FRIEND *et al.* 2001). O acompanhamento da saúde desses animais deve ser encorajado pela crescente evidência de que certas enfermidades podem causar impactos adversos nessas populações (GILARD *et al.*, 1995).

Aves selvagens podem carrear ou estar infectadas com bactérias que podem afetar sua saúde e a saúde de aves de produção, aves de estimação e do ser humano (PENNYCOTT *et al.*, 2006). Estudos reportando isolamento bacteriano de cloaca e orofaringe de psitacídeos tem sido descritos na literatura (FLAMMER; DREWES, 1988; LOIKO *et al.*, 2007; HIDASI *et al.*, 2013). Porém, a microbiota normal de aves selvagens não está bem documentada, principalmente aves de vida livre (HIDASI *et al.*, 2013), ainda não existindo tais dados para o papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*).

No Brasil, poucos estudos de sanidade em populações de psitacídeos de vida livre já foram desenvolvidos (PROENÇA *et al.*, 2011). A clamidiose é uma doença relevante para os psittacíformes, pois infecta a maioria das espécies dessa ordem (45%) (KALETA; TADAY, 2003). É uma doença aviária causada pela bactéria *Chlamydophila psittaci*, sendo contagiosa, sistêmica, zoonótica e considerada de distribuição mundial (MIRANDÉ *et al.*, 1992). Outras três enfermidades aviárias zoonóticas importantes são a Doença de NewCastle (DNC), causada por cepas virulentas do Paramyxovírus aviário tipo 1 e 2, a Influenza Aviária (IA), causada pelo vírus do gênero *Influenza A*, subtipos H5 ou H7, e a Febre do Oeste do Nilo (FON), causada por *Flavivirus*. A suspeita da presença destes três vírus em animais deve ser notificada obrigatoriamente (MAPA, 2009), sendo os dois primeiros relevantes também na avicultura mundial por serem capazes de provocar grandes perdas

econômicas (ALEXANDER, 2011; MAPA, 2009). O Brasil é considerado livre de cepas patogênicas dessas doenças virais, e o monitoramento em aves de vida livre é essencial para analisar sua circulação, pois o risco de introdução está sempre presente (MAPA, 2009; ORSI *et al.*, 2010), sendo que uma população de papagaio-de-cara-roxa nunca foi avaliada para tais vírus no Brasil.

Os papagaios são um importante e conveniente grupo de aves para o direcionamento de estudos de monitoramento de doenças, correspondendo à família com maior proporção (28%) de espécies ameaçadas (SNYDER *et al.*, 1999). O papagaio-de-cara-roxa (*A. brasiliensis*) é endêmico da floresta atlântica, ocorrendo em uma estreita faixa litorânea do sul do estado de São Paulo, estado do Paraná e norte do estado de Santa Catarina, sendo uma espécie ameaçada de extinção, classificada como “vulnerável” pela IUCN. Desde 1997, a Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental (SPVS) desenvolve o “Projeto de Conservação do Papagaio-de-cara-roxa”, cujo objetivo é contribuir com a conservação da espécie e de seu habitat (SPVS, 1999). A SPVS implanta ninhos artificiais de madeira e PVC na Área de Proteção Ambiental de Guaraqueçaba, que são ocupados pelos papagaios para reprodução.

Tratando-se de uma ave ameaçada, um estudo sanitário nesses animais seria essencial para o monitoramento da saúde da população e para a conservação da espécie, além de estabelecer parâmetros normais ainda não existentes. É também relevante diferenciar a microbiota dos papagaios nos dois tipos de ninhos utilizados, para conhecimento da influência do material sobre a saúde dos filhotes e auxílio na escolha do ninho e em medidas de manejo. Não há estudos microbiológicos comparando ninhos disponíveis na literatura.

Os objetivos do estudo foram identificar os tipos de bactéria da cloaca e da orofaringe de filhotes de papagaio-de-cara-roxa de vida livre e estabelecer padrões normais para a espécie; comparar a microbiota dos filhotes nos dois tipos de ninhos utilizados (madeira e PVC); e pesquisar os agentes infecciosos *C. psittaci*, Influenza A, Paramyxovirus-1 e Paramyxovirus-2 e Flavivirus nos filhotes.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Área de estudo e coleta de amostras

Coletas de amostras de 74 filhotes de *Amazona brasiliensis* foram realizadas em ninhos situados na ilha Rasa, localizada na Área de Proteção Ambiental de Guaraqueçaba, litoral do estado do Paraná, Brasil (25° 15' - 25° 30' S; 48° 20' - 48° 30' W). Trata-se de uma unidade de conservação com extensa área de floresta atlântica, composta por estuários, ilhas, manguezais, planícies e montanhas, na qual o papagaio-de-cara-roxa nidifica. Infelizmente, a APA de Guaraqueçaba ainda sofre com desflorestamento e captura de animais para o tráfico, afetando especialmente o *A. brasiliensis* (CARRILO; BATISTA, 2007; SPVS, 1992).

A coleta de amostras foi realizada concomitante ao monitoramento dos filhotes realizado pela SPVS em 5 expedições a campo, no período reprodutivo (outubro a fevereiro) de 2013/2014. Os ninhos nas árvores foram acessados por técnica de rapel de ascensão vertical em dossel. Os papagaios foram retirados dos ninhos e contidos manualmente para a coleta de amostras.

Para pesquisa de anticorpos, amostras de sangue da veia ulnar superficial foram coletadas de 64 indivíduos utilizando seringas de 1 mL e agulhas de insulina estéreis. As amostras foram acondicionadas em tubos com heparina e refrigeradas por no máximo 24 horas. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos para obtenção do plasma, que foi congelado até realização da análise para *C. psittaci*.

Em 38 filhotes foram realizadas coletas de material da cloaca e orofaringe para análise microbiológica, com swabs estéreis. Amostras foram coletadas de 23 indivíduos provenientes de ninhos de madeira e de 15 aves provenientes de ninhos de PVC. Os swabs foram mantidos refrigerados em meio de transporte Stuart por no máximo 48 horas até o processamento no laboratório.

Em 58 filhotes foram realizadas coletas de material da cloaca e orofaringe com swabs estéreis, para detecção de *C. psittaci*, e em 50 indivíduos para detecção dos vírus da IA, DNC e FON. Ambas foram mantidas congeladas em tubos tipo eppendorf contendo meio PBS, antibiótico e antifúngico até análise nos laboratórios.

#### **4.2.2 Pesquisa de anticorpos**

A pesquisa de anticorpos para *C. psittaci* foi realizada no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná pelo teste de ELISA modificado de acordo com instruções do fabricante (ImmunoComb Avian *Chlamydophila psittaci* Antibody Test Kit – Biogal Galed Labs., Israel).

#### **4.2.3 Análises microbiológicas**

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Análise da Água e Microbiologia da Estação Ecológica de Carijós, localizada em Florianópolis, Santa Catarina. As amostras foram semeadas em caldo BHI e foram incubadas por 24 horas a 37°C em estufa. Posteriormente, foram congeladas a – 20°C com 30 % de glicerina. Quando descongeladas, foram estriadas em placas de petri com ágar sangue e ágar MacConkey e acondicionadas em estufa a 37°C por 24 horas. Posteriormente, foram feitas a caracterização morfológica das colônias que cresceram, a técnica de coloração de Gram e a prova da catalase. Cada colônia pura foi inoculada no ágar TSI por picada e por estria na superfície inclinada, e ficou à 37°C durante 24 horas para observação da fermentação de carboidratos, produção de H<sub>2</sub>S e gás. Por último, a colônia identificada como fermentadora foi inoculada no conjunto de provas bioquímicas do kit para enterobactérias *Newprov*, onde permaneceram por 48 horas a 37°C em estufa.

O kit fornece leituras das seguintes provas bioquímicas: desaminação do L-Triptofano (LTD) ou Triptofano-Desaminase (TRI); produção de gás sulfídrico (H<sub>2</sub>S); fermentação da glicose (GLI); produção de gás a partir da glicose (GAS); descarboxilação da L-Lisina (LIS); produção de Indol (IND); descarboxilação da Ornitina (ORN); motilidade (MOT); utilização do citrato como única fonte de Carbono (CIT) e fermentação da Rhamnose (RHA). A identificação das bactérias foi realizada segundo Winn *et al.* (2008), com auxílio de uma tabela disponibilizada pela *Newprov*.

#### 4.2.4 Reação em cadeia da polimerase convencional

As análises de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de *C. psittaci* foram realizadas no Laboratório de Ornitopatologia II do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP). As amostras passaram por 2 minutos de vórtex e foram centrifugadas a 20.000 g por 30 minutos a 8°C. O sobrenadante foi descartado e a extração de DNA foi realizada utilizando o kit de purificação de DNA (NucleoSpin® Tissue – Macherey-Nagel, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi submetido, então, a uma PCR convencional utilizando os *primers* CpsiA (5'-ATGAAACATCCAGTCTAC TGG-3') e CpsiB (5'-TTGTGTAGTAATATTATCAAA-3') de acordo com a literatura (LAROCAU *et al.*, 2001), obtendo-se um fragmento de 300 pares de bases.

A reação de amplificação foi realizada com 5 µL do DNA *template*, 12,5 µL de DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific, Estados Unidos), 0,5 µL de cada *primer* e 6,5 µL de água estéril, formando volume final de 25 µL. No termociclador, as condições para a PCR foram de 5 minutos a 94°C, 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, a 50°C por 1 minuto e a 72°C por 2 minutos, e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os controles positivos e negativos foram inseridos na PCR. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™.

#### 4.2.5 Reação em cadeia da polimerase em tempo real

As reações de PCR em tempo real (RT-PCR) *one step* para detecção dos vírus *Influenza* A, DNC e FON foram realizadas no Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas II, do Departamento de Microbiologia da USP. Para extração do material genético, foram utilizados 150 µL de amostras provenientes de swab cloacal e de orofaringe. Para cada amostra foram adicionados 700 µL de tampão NucliSENS® easyMag Lysis. Após 10 minutos de reação em temperatura ambiente, foram adicionados 30 µL de sílica magnética, e todo o processo de extração foi realizado em equipamento automatizado de acordo com as instruções do fabricante (NucliSENS® Iso Kit – Biomérieux).

Em seguida, foram submetidas à reação de *one step* RT-PCR, utilizando 8,63 µL de RNA extraído e foram adicionados 12,5 µL de 2x RT-PCR buffer, 1,2 µL de 25x AIV-M Primer/Probe mix, 1,0 µL de 25x RT-PCR enzimas e 1,67 µL de *Detector Enhancer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), totalizando 25 µL de volume final de reação para IA (ARAUJO *et al.*, 2014). Para DNC, foram utilizados *primers* já descritos, sendo realizado como multiplex para NDV classe 1 e 2 (KIM *et al.*, 2008). E para FON foram utilizados *primers* e sondas específicas descritas por Ometto *et al.* (2013).

As condições utilizadas foram: 45°C por 20 minutos (Transcrição Reversa), seguida de 95°C por 10 min, seguindo 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60 °C por 45 segundos. Para leitura e coleta dos dados foi utilizado o equipamento 7300 PCR System (Applied Biosystems).

#### 4.2.6 Análise estatística

A análise estatística para comparação da microbiota dos ninhos foi realizada com o software “Portal Action”, com teste de normalidade Shapiro-Wilk e análise de variância (ANOVA) com 5% de confiança.

### 4.3 RESULTADOS

Foram isoladas 125 colônias bacterianas das amostras dos papagaios, com identificação de 19 espécies de bactérias, e três com identificação apenas do gênero (Tabela 1), totalizando 98,4% de amostras positivas para enterobactérias. As espécies com maior prevalência de isolamento foram *Escherichia coli* (70,73%), *Klebsiella oxytoca* (39,13%), *Klebsiella pneumoniae* (30,43%) e *Enterobacter aerogenes* (30,43%), todas gram-negativas. Apenas uma espécie de gram-positiva foi isolada, presente em um ninho de madeira, sendo *Staphylococcus* sp. *Salmonella enteritidis* foi detectada em três amostras dos filhotes e *Salmonella* spp. em apenas duas. A microbiota dos papagaios não diferiu em relação ao tipo de ninho.

Todas as amostras analisadas por sorologia e por meio da PCR convencional e RT-PCR para *C. psittaci*, IA, DNC e FON foram negativas.

Tabela 1. Prevalência de bactérias isoladas de swab cloacal e de orofaringe de acordo com o ninho em filhotes de *Amazona brasiliensis* de vida livre no Paraná

Espécie	Prevalência em ninhos	Prevalência em ninhos de
	de madeira (%) n=23	PVC (%) n=15
<i>Escherichia coli</i>	73,91	80,00
<i>Escherichia fergusonii</i>	4,35	6,67
<i>Klebsiella oxytoca</i>	39,13	40,00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	30,43	20,00
<i>Proteus mirabilis</i>	26,09	13,33
<i>Proteus vulgaris</i>	0,00	6,67
<i>Citrobacter diversus (koseri)</i>	0,00	6,67
<i>Citrobacter werkmanii</i>	4,35	0,00
<i>Citrobacter freundii</i>	0,00	6,67
<i>Salmonella enteridis</i> (grupo)	13,04	0,00
<i>Salmonella</i> sp.	4,35	6,67
<i>Enterobacter aerogenes</i>	30,43	20,00
<i>Enterobacter cloacae</i>	4,35	13,33
<i>Enterobacter gergoviae</i>	4,35	0,00
<i>Enterobacter sakazakii</i>	8,70	0,00
<i>Serratia liquefaciens</i> (grupo)	13,04	13,33
<i>Serratia rubidaea</i>	4,35	0,00
<i>Morganella morgani</i>	4,35	6,67
<i>Hafnia alvei</i>	4,35	6,67
<i>Staphylococcus</i> sp.	8,70	0,00
<i>Kluyvera</i> sp.	0,00	6,67
<i>Providencia rettgeri</i>	4,35	0,00



## 4.4 DISCUSSÃO

### 4.4.1 Análise microbiológica

Os resultados do trabalho indicam que a microbiota de filhotes saudáveis de *A. brasiliensis* de vida livre possui normalmente bactérias gram-negativas em sua composição. Geralmente é aceito que a flora bacteriana normal de papagaios é predominantemente composta por bacilos gram-positivos, embora ocorra divergência na significância e normalidade da presença de bactérias gram-negativas (BANGERT *et al.*, 1988; DONELEY, 2009; FUDGE, 2001; GRAHAM; GRAHAM, 1978). Muitas vezes, estas são consideradas potencialmente patogênicas ou oportunistas, e desequilíbrios envolvendo aumento desses microrganismos podem ser interpretados como distúrbio entérico, mas algumas pesquisas indicam que sua presença não implica em doença (SCHEREMMER *et al.*, 1999).

A detecção de bactérias gram-negativas já foi reportada em outras pesquisas com filhotes assintomáticos de *Amazona aestiva* e *Anodorhynchus hyacinthinus* de vida livre em 100% das amostras (LOIKO *et al.*, 2007, SAIDENBERG, 2008). Cavalheiro (1999) encontrou bactérias gram-negativas em 69% de 13 amostras e em 25% de 16 amostras cloacais de filhotes de *A. brasiliensis* de vida livre no estado de São Paulo. No primeiro grupo predominou a bactéria *E. coli*, e no segundo as bactérias *E. coli*, *Proteus mirabilis* e *Salmonella enteritidis*. Um estudo com 14 filhotes saudáveis de *A. hyacinthinus* de vida livre no Pantanal demonstrou um maior percentual de bactérias gram-negativas isoladas, como *E. coli* (86%), *Enterobacter* sp. (64%), *Klebsiella* sp. (50%), *Enterococcus* sp. (43%) e *Salmonella braenderup* (07%), em relação a gram-positivas, com 29% das amostras contendo *Staphylococcus* sp. (LOIKO *et al.*, 2007). Outro estudo com psitacídeos capturados do comércio ilegal em Goiás avaliou a frequência de enterobactérias na microbiota intestinal de 300 aves, resultando no isolamento de *E. coli* (53,7%), *Enterobacter* sp. (51,0%), *Klebsiella* sp. (29,7%), *Citrobacter* sp. (19,7%), além de *Salmonella* sp. (0,33%) e outras bactérias (HIDASI *et al.*, 2013). Já em outros estudos com filhotes de araras-azuis de vida livre (ABILLEIRA *et al.*, 2006) e cacatuas selvagens na Austrália (HARRISON; MACDONALD, 2003), o percentual de bactérias gram-negativas nas fezes foi muito baixo (1,7% no primeiro estudo).

A microbiota gastrointestinal é afetada por muitos fatores como dieta, ambiente, administração de antibióticos e infecção com organismos patogênicos (LU *et al.*, 2003). Muitos desses fatores diferem significativamente entre papagaios de vida livre e cativo, e a microbiota intestinal de um pode não refletir com precisão a microbiota normal do outro (XENOLIUS *et al.*, 2010). A maioria dos estudos microbiológicos envolvem psittacídeos adultos de cativo, sendo que alguns trazem como resultado a presença de bactérias gram-negativas em indivíduos saudáveis, e outros reportam a presença desses microrganismos em animais doentes (BOWMAN; JACONSON, 1980; FLAMMER *et al.*, 1988). Por isso, somente a técnica de isolamento das enterobactérias pode não ser suficiente para estabelecer a ocorrência de doença nos filhotes assintomáticos do presente estudo. Em cativo, a presença de bactérias gram-negativas pode ser considerada mais grave ou anormal pelo manejo precário (estresse e nutrição inadequada) muitas vezes imposto às aves (SAIDENBERG, 2008). Além disso, são desafiadas por uma carga bacteriana maior, tendo contato com animais sinantrópicos, outras aves, animais domésticos e o próprio ser humano (SAIDENBERG, 2008), resultando em maior índice de morbidade e mortalidade. Já os filhotes de vida livre no meio natural enfrentam acúmulo de fezes e matéria orgânica, além da possível utilização prévia dos ninhos por outras espécies.

*Escherichia coli* foi a bactéria isolada mais prevalente nos papagaios (97,5%). Enquanto alguns autores consideram a presença de *E. coli* como um sinal de doença, outras pesquisas a revelam como um componente normal da microbiota intestinal em psitacídeos, causando doença de maneira oportunista (hidasi). Flammer e Drewes (1988) analisaram swabs de cloaca de 506 psitacídeos saudáveis de 22 espécies, e encontraram *E. coli* em 60% das cacatuas (*Cacatua* sp.) amostradas e apenas em 18% das outras espécies de psitacídeos. Isso mostra também que ocorre diferença interespecie, já que os animais estavam alojados no mesmo local com dieta e manejo semelhantes. Jones e Nisbet (1980) encontraram *E. coli* em 46% de 54 psitacídeos sem lesões intestinais necropsiados no Zoológico de Londres. No presente estudo, os autores consideram a presença da bactéria como pertencente à flora intestinal normal dos filhotes de *A. brasiliensis*, podendo ser uma característica da espécie.

Outra bactéria importante identificada foi a *Salmonella*, cujo potencial zoonótico já foi reportado em aves de cativeiro, inclusive em psitacíformes, podendo ser uma fonte importante de infecção também para aves de produção (KOMOROWISKI; HENSLEY, 1973; MADEWELL; MCCHESENEY, 1975; WARD *et al.*, 2003). A *Salmonella enteritidis* é segunda bactéria mais envolvida na salmonelose de psitacídeos, estando atrás da *S. typhimurium* (KOMOROWISKI; HENSLEY, 1973; ORISZ *et al.*, 1992). Já foi encontrada em três indivíduos de *A. aestiva* adultos saudáveis (MARIETTO-GONÇALVES *et al.*, 2010), e em indivíduos sintomáticos de *A. finschi* e *Pyrrhura molinae* (OROSZ *et al.*, 1992), também de cativeiro. Não há relatos de mortalidade por *S. enteritidis* em psitacídeos de vida livre e existem poucos estudos relatando óbito em cativeiro, com a manifestação de sinais principalmente em animais jovens (MARIETTO-GONÇALVES *et al.*, 2010). Trata-se de um achado relevante, pois os filhotes são manipulados no monitoramento do período reprodutivo e possivelmente podem transmitir a bactéria, sendo indispensável o uso de equipamentos de proteção individual na captura e contenção dessas aves.

#### **4.4.2 Pesquisa de anticorpos e Reação em cadeia da polimerase**

Alguns perfis de saúde envolvendo pesquisa de patógenos em psitacídeos de vida livre já foram reportados. Deem *et al.* (2005), realizando sorologia em indivíduos de *A. aestiva* de vida livre na Bolívia, encontraram todos negativos para o vírus da IA, *C. psittaci* e Paramyxovirus-1, sendo 67,34% (33/49) positivos para *S. pullorum*. Gilardi *et al.* (1995), traçando o perfil sanitário de *Aratinga weddellii* e *Brotogeris sanctithomae* no Peru, observaram todos os animais negativos para *C. psittaci* e Paramyxovirus-1 por meio de sorologia. Pesquisando araras de vida livre e cativeiro do gênero *Ara* spp. no Peru, Karesh *et al.* (1997) reportaram por testes sorológicos que todos os animais foram negativos para IA, *C. psittaci* e Paramyxovirus-1, sendo 32% (8/25) dos indivíduos testados positivos para *Salmonella* spp. Stone *et al.* (2005), realizando testes sorológicos de 50 indivíduos de papagaios de vida livre das espécies *Amazona autumnalis*, *A. oratrix*, *A. viridigenalis* e *Rhynchopsitta pachyrhyncha* para os agentes da IA, Paramyxovirus-1 e 2, encontraram todos negativos.

No Brasil, alguns estudos de prevalência e surtos de clamidiose em papagaios de cativeiro já foram registrados (RASO *et al.*, 2002; RASO *et al.*, 2004). Cavalheiro (1999) pesquisou anticorpos para *C. psittaci* por meio do teste de ELISA modificado em 14 filhotes de *A. brasiliensis* de vida livre no estado de São Paulo, encontrando 6 indivíduos com reação fracamente positiva (títulos entre menor que 1 e 1). Ribas *et al.* (2014) encontraram 1,2% (1/117) de positividade para *C. psittaci* por meio da PCR em filhotes de *A. brasiliensis* de vida livre no mesmo local do presente estudo, sendo uma baixa prevalência e estando de acordo o resultado aqui demonstrado. Raso *et al.* (2006), pesquisando por meio de swabs de cloaca e traquéia de 32 indivíduos de vida livre de *A. aestiva* e 45 de *A. hyacinthinus* submetidos ao exame de PCR, constatou 6,3% e 26,7% de positividade para swabs de cloaca, respectivamente, e 8,9% de *A. hyacinthinus* positivos por swabs de traquéia.

A presença de FON ainda não foi detectada em aves no Brasil, mas amostras de soro de cinco aves provenientes do Rio Grande do Sul e do Pará foram positivas pela técnica de ELISA, porém não foram confirmadas pelo teste de neutralização por redução de placas (OMETTO *et al.*, 2013).

A IA já foi detectada pela PCR em aves migratórias na região amazônica e animais com sorologia positiva também já foram descritos no estado de São Paulo (ARAUJO *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2013). Raramente é reportado o isolamento de IA em psitacídeos, sendo seu papel ainda não esclarecido na ecologia, patogenicidade, e transmissão do vírus a aves domésticas (PERKINS; SWAYNE, 2003).

Aves selvagens de cativeiro e de vida livre positivas para DNC também já foram reportadas no Brasil (SILVA *et al.*, 2006; THOMAZELLI *et al.*, 2013).

#### **4.5 CONCLUSÃO**

O achado desta pesquisa difere de alguns estudos anteriores envolvendo a microbiologia de psitacíformes, mas é sustentado com estudos recentes em animais de vida livre, nos quais bactérias gram-negativas foram achados considerados normais e característicos da espécie. Os resultados negativos para os agentes infecciosos pesquisados já eram esperados e também são amparados por estudos

anteriores envolvendo papagaios de vida livre. A microbiota dos filhotes não diferiu em relação ao tipo de ninho, sendo que o material não interfere então na prevalência de determinadas bactérias.

A avaliação da saúde de filhotes de *A. brasiliensis in situ* deste estudo possibilitou a obtenção de dados ainda não descritos para a espécie, fornecendo informações da saúde atual de uma população selecionada e um ponto de referência para futuras avaliações e interpretações de resultados laboratoriais em planos de conservação. A pesquisa de potenciais patógenos que possam trazer riscos a uma população ameaçada de extinção é fundamental para a conservação das espécies e deve ser cada vez mais encorajada.

## REFERÊNCIAS

- ABILLEIRA, F. S.; CORBELLINI, A. O.; ALLGAYER, M. C.; GUEDES, N. M. R.; WEIMER, T. A.; OLIVEIRA, S. J. Verificação da microbiota fecal em filhotes de arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) de vida livre no pantanal através da técnica de coloração de gram. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE DE ZOOLOGICOS DO BRASIL, 30., 2006, Brasília, DF. **Anais...** Brasília: SZB, 2006, p. 43.
- ALEXANDER, D. J. Newcastle disease in the European Union 2000 to 2009. **Avian Pathology**, v. 40, n. 6, p. 547-558, 2011.
- ARAUJO, J.; AZEVEDO, JÚNIOR, S. M.; GAIDET, N.; HURTADO, R. F.; WALKER, D. *et al.* Avian Influenza Virus (H11N9) in Migratory Shorebirds Wintering in the Amazon Region, Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 1-10, 2014.
- BANGERT, R. L.; CHO, B. R.; WIDDERSN P. R.; STAUBER, E. H.; WARD, A. C. S. A survey of aerobic bacteria and fungi in feces of healthy psittacine birds. **Avian diseases**, v. 33, p. 46-52, 1988.
- BOWMAN, T. A.; JACOBSON, E. R. Cloacal flora of clinically normal captive psittacine birds. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 11, p. 81-85, 1980.
- CARRILO, A. C.; BATISTA, D. B. Conservação do papagaio-da-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) no estado do Paraná - uma experiência de educação ambiental no ensino formal. **Revista Árvore**, v. 31, n. 1, p. 113-122, 2007.
- CAVALHEIRO, M. L. **Qualidade do ambiente e características fisiológicas do papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) na Ilha Comprida – São Paulo**. Curitiba. 105 p. 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

DEEN, S. L.; NOSS, A. J.; CUELLAR, R. L.; KARESH, W. B. Health evaluation of free-ranging and captive blue-fronted amazon parrots (*Amazona aestiva*) in the Gran Chaco, Bolivia. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 36, n. 4, p. 598–605, 2005.

DONELEY, R. J. T. Bacterial and parasitic diseases of parrots. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 12, p. 417-432, 2009.

FLAMMER, K; DREWES, L. A. Species-related differences in the incidence of gram-negative bacteria isolated from the cloaca of clinically normal psittacine birds. **Avian Diseases**, v. 32, p. 79-83, 1988.

FRIEND, M.; MCLEAN, R. G.; DEIN, F. J. Disease emergence in birds: challenges for the twenty-first century. **The Auk**, v. 118, n. 2, p. 290–303, 2001.

FUDGE, A. M. Diagnosis and treatment of avian bacterial diseases. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 10, n. 1, p. 3-11, 2001.

GILARDI, K. V. K.; LOWENSTIME, L. J.; GILARDI, J. D.; MUNN, C. A. A survey for selected viral, chlamydial, and parasitic diseases in wild dusky-headed parakeets (*Aratinga weddellii*) and tui parakeets (*Brotogeris sanctithomae*) in Peru. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 31, n. 4, p. 523-528, 1995.

GRAHAM, C L.; GRAHAM, D L. Ocurrance of *Escherichia coli* in feces of psittacine birds. **Avian Diseases**, v. 22, n. 4, p. 717-720, 1978.

HARRISON, G. J.; MACDONALD, D. Preliminary field study of fecal gram's stain results in two free-ranging Australian parrots species. **Exotic DVM**, v. 4, n. 6, p. 10-11, 2003.

HIDASI, H. W.; NETO, J. H.; MORAES, D. M. C.; LINHARES, G. F. C.; JAYME, V. S.; ANDRADE, M. A. Enterobacterial detection and *Escherichia coli* antimicrobial resistance in parrots seized from the illegal wildlife trade. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 44, n. 1, p. 1-7, 2013.

JONES, D. M.; NISBET, D. J. The gram negative bacterial flora of the avian gut. **Avian Pathology**, v. 9, p. 33-38, 1980.

KALETA, E. F.; TADAY, E. M. A. Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. **Avian Pathology**, v. 32, n. 5, p. 435-462, 2003.

KARESH, W. B.; DEL CAMPO, A.; BRASELTON, W. E.; PUCHE, H.; COOK, R. A. Health evaluation of free-ranging and hand-reared macaws (*Ara* spp.) in Peru. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 28, n. 4, p. 368-377, 1997.

KIM, L. M.; SUAREZ, D. L.; AFONSO, C. L. Detection of a broad range of class I and II Newcastle disease viruses using a multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, p. 414–425, 2008.

KOMOROWSKI, R. A.; HENSLEY, G. T. Epizootic salmonellosis in an open zoo aviary. **Archives of Environmental Health**, v. 27, p. 110–111, 1973.

LAROUCAU, K.; SOURIAU, A.; RODOLAKIS, A. Improved sensitivity of PCR for *Chlamydophila* using pmp genes. **Veterinary Microbiology**, v. 82, p. 155-164, 2001.

LOIKO, M. R.; ABILHEIRA, F. S.; GUEDES, N. R.; PASSOS, D. T.; WEIMER, T. A.; OLIVEIRA, S. J.; ALLGAYER, M. C. Identificação da microbiota da orofaringe e cloaca em filhotes de arara-azul-grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) de vida livre do Pantanal – MS. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, p. 29-35, 2007.

LU, J.R.; IDRIS, U.; HARMON, B.; HOFACRE, C.; MAURER, J.J.; LEE, M.D. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6816–6824, 2003.

MADEWELL, B. R.; MCCHESENEY, A. E. Salmonellosis in a human infant, a cat, and two parakeets in the same household. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 167, p. 1089–1090, 1975.

MARIETTO-GONÇALVES, G. A.; ALMEIDA, S. M.; LIMA, E T.; OKAMOTO, A. S.; PINCZWOWSKI, P.; FILHO, R. L. A. Isolation of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* in Blue-fronted Amazon parrot (*Amazona aestiva*). **Avian Diseases**, v. 54, p. 151-155, 2010.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Plano de Contingência para Influenza Aviária e Doença de NewCastle**. 2009.

MIRANDÉ, L. A.; HOWERTH, E. W.; POSTON, R. P. Chlamydiosis in a Red-tailed Hawk (*Buteo jamaicensis*). **Journal of Wildlife diseases**, v. 28, n.2, p. 284-287, 1992.

OMETTO, T.; DURIGON, E. L.; ARAUJO, A.; APRELON, R.; AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T. *et al.* West nile virus surveillance, Brazil, 2008-2010. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, p. 723-730, 2013.

OROSZ, S. E.; CHENGAPPA, M. M.; OYSTER, R. A.; MORRIS, P. J.; TROCK, S.; ALTEKRUSE, S. *Salmonella enteritidis* infection in two species of Psittaciformes. **Avian Diseases**, v. 36, p. 766–769, 1992.

ORSI, M. A.; DORETTO, J. L.; CAMILLO, S. C. A.; REISCHAK, D.; RIBEIRO, S. A. M.; RAMAZZOTI, A.; MENDONÇA, A. O.; SPILKI, F. R.; BUZINARO, M. G.; FERREIRA, H. L.; ARNS, C. W. A survey for maintenance of virulent Newcastle disease virus-free area in poultry production in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 368-375, 2010.

PENNYCOTT, T. W.; PARK, A.; MATHER, H. A. Isolation of different serovars of *Salmonella enterica* from wild birds in Great Britain between 1995 and 2003. **Veterinary Record**, v. 158, p. 817-820, 2006.

PERKINS, L. E. L.; SWAYNE, D. E. Varied pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 Avian influenza virus in four passerine species and budgerigars. **Veterinary Pathology**, v. 401, p. 14–24, 2003.

PROENÇA, L. M.; FAGLIARI, J. J.; RASO, T. F. Infecção por *C. psittaci*: uma revisão com ênfase em psitacídeos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 5, p.841-847, 2011.

RASO, T. F.; JUNIOR, A. B.; PINTO, A. A. Evidence of *Chlamydophila psittaci* infection in captive amazon parrots in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 33, n. 2, p. 118–121, 2002.

RASO, T. F.; SEIXAS, G. H. F.; GUEDES, N. M. R.; PINTO, A. A. *Chlamydophila psittaci* in free-living Blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) and Hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 117, p. 235–241, 2006.

RASO, T. F.; SEIXAS, G. H. F.; GUEDES, N. M. R.; PINTO, A. A. *Chlamydophila psittaci* in free-living Blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) and Hyacinth macaws (*Anodorhynchus hyacinthinus*) in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 117, p. 235–241, 2006.

RASO, T.F.; GODOY, S. N.; MILANELO, L.; SOUZA, C. A. I.; MATUSHIMA, E. R.; JUNIOR, J. P. A.; PINTO, A.A. An outbreak of chlamydiosis in captive Blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) in Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 35, p. 94–96, 2004.

RIBAS, J. M.; SIPINSKI, E. A. B.; SERAFINI, P. P.; FERREIRA, V. L.; RASO, T. F.; PINTO, A. A. *Chlamydophila psittaci* assessment in threatened Red-tailed Amazon (*Amazona brasiliensis*) parrots in Paraná, Brazil. **Ornithologia**, v. 6, n. 2, p. 144-147, 2014.

SAIDENBERG, A. E. S. **Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de psitacídeos com diferentes manifestações clínicas**. São Paulo. 91 f. 2008. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SCHREMMER, C.; LOHR, J. E.; WASTLHUBER, KOSTERS, J.; RAVELSHOFER, K.; STEINRUCK, H.; WIELER, L. H. Enteropathogenic *Escherichia coli* in Psittaciformes. **Avian Pathology**, v. 28, p. 349–354, 1999.

SILVA, J. S. A.; MOTA, R. A.; VILELA, S. M. O.; DORETTO JUNIOR, L.; PINHEIRO JUNIOR, W.; SILVA, L. G. B. Newcastle disease vírus infection in Sparrows (*Passer domesticus*, Linnaeus, 1758) captured in poultry farms of the agreste region of the state of Pernambuco. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 8, n. 2, p. 125-129, 2006.



SNYDER, N. F. R.; MCGOWAN, P.; GILARDI, J.; GRAJAL, A. **Parrots—Status Survey and Conservation Action Plan**. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, Reino Unido, 1999.

SOUZA, E.; COSTA, T. P.; WERTHER, K.; DURIGON, E. L.; ARAUJO, J.; FERREIRA, C. S.; PINTO, A. A. Presence of antibodies against H5, H7 and H9 influenza A vírus in wild birds in the state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 15, n. 3, p. 169-286, 2013.

SPVS - Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental. **Plano integrado de conservação para a região de Guaraqueçaba, Paraná**, Brasil. Vol. II. 1992; Curitiba.

SPVS – SOCIEDADE DE PESQUISA EM VIDA SELVAGEM E EDUCAÇÃO AMBIENTAL. 1999. Projeto saúde comunitária, educação e conservação para a região de Guaraqueçaba, Paraná, Brasil. **Relatório de atividades** 1998. Curitiba

STONE, E. G.; MONTIEL-PARRA, G.; PEREZ, T. M. A survey of selected parasitic and viral pathogens in four species of mexican parrots, *Amazona autumnalis*, *Amazona oratrix*, *Amazona viridigenalis*, and *Rhynchopsitta pachyrhyncha*. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 36, n. 2, p. 245-249, 2005.

THOMAZELLI, L. M.; ARAUJO, J.; FERREIRA, S. C.; HURTADO, R.; OLIVEIRA, D. B.; OMETTO, T.; GOLONO, M.; SANFILIPPO, L.; DEMETRIO, C.; FIGUEIREDO, M. L.; DURIGON E. L. Molecular surveillance of the Newcastle disease vírus in domestic and wild birds on the north eastern coast and amazon bioma of Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 14, n. 1, p. 1-7, 2012.

WARD, M. P.; RAMER, J. C.; PROUDFOOT, J.; GARNER, M. M.; JUAN-SALLÉS, C.; WU, C. C. Outbreak of salmonellosis in a zoologic collection of Lorikeets and Lories (*Trichoglossus*, *Lorius*, and *Eos* spp.). **Avian Diseases**, v. 47, p. 493-498, 2003.

WINN, W. C.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; KONEMAN, E. W.; PROCOP G. W.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WOODS, G. L. **Koneman, diagnóstico microbiológico : texto e atlas colorido**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

XENOLIUS P. G.; GRAY, P. L.; BRIGHTSMITH, D.; PALCULICT, B.; HOPPES, S.; STEINER, J. M.; TIZARD, I.; SUCHODOLSKI, J. S. Molecular characterization of the cloacal microbiota of wild and captive parrots. **Veterinary Microbiology**, v. 146, p. 320-325, 2010.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este foi o primeiro estudo para estabelecimento de um perfil de saúde completo para o papagaio-de-cara-roxa no estado do Paraná, com determinação de intervalos de referência para parâmetros hematológicos, bioquímicos, pesquisa de anticorpos e agentes infecciosos. A confiança nos resultados observados foi possível de ser obtida devido ao grande número de animais amostrados no período reprodutivo de 2013/2014.

A pesquisa contemplou parte da ação 3.10 incluída na meta III do “Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Papagaios da Mata Atlântica”, elaborado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, uma autarquia em regime especial vinculada ao Ministério do Meio Ambiente, cujo objetivo é “caracterizar o perfil sanitário das populações do papagaio-de-cara-roxa em vida livre”.

Os achados deste estudo são essenciais para avaliar efeitos das mudanças ambientais na população de aves amostradas. Por ser considerada uma espécie bioindicadora, os dados observados no papagaio-de-cara-roxa contribuem para descrever as condições ambientais em que vivem. Os resultados podem ser atribuídos como normais, ou seja, trata-se de uma população de vida livre saudável, que encontra condições adequadas para reprodução e uma boa fonte de alimentos na Área de Proteção Ambiental de Guaraqueçaba, indicando uma boa conservação do ambiente. Isso reflete os esforços e ações da Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Conservação Ambiental no local, que desde 1997 desenvolve o “Projeto de Conservação do Papagaio-de-cara-roxa” com o objetivo de contribuir com a conservação da espécie e de seu *habitat*.

A avaliação da saúde de filhotes de *A. brasiliensis* de vida livre deste estudo forneceu informações da situação atual de uma população selecionada e um ponto de referência para futuras avaliações e interpretações de resultados laboratoriais em planos de conservação. Os dados podem servir como guia para alterações que podem ser esperadas em uma população de papagaios de vida livre localizada em uma área bem conservada. O banco de dados gerado é importante para auxiliar planos de conservação e monitorar a saúde do papagaio-de-cara-roxa, uma espécie de ave ameaçada.

## 6. ANEXOS

### 6.1 CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA SCA



Universidade Federal do Paraná  
Setor de Ciências Agrárias  
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA

#### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 050/2013, referente ao projeto “Perfil sanitário de filhotes de *Amazona brasiliensis* no estado do Paraná: parâmetros clínicos, hematológicos e pesquisas de agentes infecciosos”, sob a responsabilidade de Frederico Fontanelli Vaz, na forma em que foi apresentado (uso de 50 aves), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 11 de setembro de 2013.

#### CERTIFICATE

We certify that the protocol number 050/2013, regarding the project “Health status of *Amazona brasiliensis* nestlings in Parana state: clinical and hematological parameters and prevalence of infectious agents”, under Frederico Fontanelli Vaz’s supervision, in the terms it was presented (use of 50 birds), was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on September 11, 2013.

Curitiba, 11 de setembro de 2013.

Patrick Schmidt

Presidente

Ricardo Guilherme D’Otaviano  
de Castro Vilani  
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Setor de Ciências Agrárias  
Universidade Federal do Paraná.

## 6.2 CERTIFICADO DE AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA – SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 41035-1	Data da Emissão: 11/10/2013 14:56	Data para Revalidação*: 10/11/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Frederico Fontanelli Vaz	CPF: 368.943.938-85
Título do Projeto: PERFIL SANITÁRIO DE FILHOTES DE AMAZONA BRASILIENSIS NO ESTADO DO PARANÁ: PARÂMETROS CLÍNICOS, HEMATOLÓGICOS E PESQUISA DE AGENTES INFECCIOSOS	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	CNPJ: 75.095.679/0001-49

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de amostras biológicas dos papagaios-de-cara-roxa	10/2013	03/2014
2	Coleta de suabes dos ninhos dos papagaios-de-cara-roxa	10/2013	03/2014

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Cristiane Kiyomi Miyaji Kolesnikovas	Pesquisadora	176.142.858-67	15481877 SSP-SP	Brasileira
2	Yara de Oliveira Brandão	Pesquisadora	370.399.658-79	356030003 SSP-SP	Brasileira
3	Rosângela Locatelli Dittrich	Pesquisadora e orientadora do projeto	728.634.989-91	34834180 IIPR-PR	Brasileira
4	Tânia de Freitas Raso	Pesquisadora	737.841.846-34	4222223 SSP-MG	Brasileira
5	PATRICIA PEREIRA SERAFINI	Pesquisadora	027.472.819-22	66214524 SESP-PR	Brasileira
6	Elenise Angelotti Bastos Sipinski	Pesquisadora	722.516.209-82	3.126.111-2 SSP-PR	Brasileira
7	Jansen de Araujo	Pesquisador	286.516.198-63	27412780-5 SSP-SP	Brasileira
8	Fabiana Tieme da Silva	Pesquisadora	008.842.169-42	7307669-2 SESP-PR	Brasileira
9	RAFAEL HIDEKI HAGI	Pesquisador	042.728.799-52	70692112 SSPPR-PR	Brasileira
10	Carlos Czapak Kroetz	Pesquisador	066.880.859-41	5560211 SSP-SC	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 64685649



Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 41035-1	Data da Emissão: 11/10/2013 14:56	Data para Revalidação*: 10/11/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Frederico Fontanelli Vaz	CPF: 368.943.938-85
Título do Projeto: PERFIL SANITÁRIO DE FILHOTES DE AMAZONA BRASILIENSIS NO ESTADO DO PARANÁ: PARÂMETROS CLÍNICOS, HEMATOLÓGICOS E PESQUISA DE AGENTES INFECCIOSOS	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	CNPJ: 75.095.679/0001-49

1	Maria Cecilia Abbud	Pesquisadora	049.180.979-44	8628939-3 IIP-PR	Brasileira
---	---------------------	--------------	----------------	------------------	------------

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		PR	ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DE GUARAQUEÇABA	UC Federal
2		PR	ESTÇÃO ECOLÓGICA DE GUARAQUEÇABA	UC Federal
3		PR	PARQUE NACIONAL DO SUPERAQUI	UC Federal

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Amazona brasiliensis
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Amazona brasiliensis
3	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	Bactéria

#### Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Sangue, Outras amostras biológicas(Suabe de cloaca e traquéia), Penas, Ectoparasita, Fezes
2	Amostras biológicas (Microorganismos)	Outras amostras biológicas(Suabe dos ninhos das aves)
3	Método de captura/coleta (Aves)	Outros métodos de captura/coleta(Captura de filhotes nos ninhos, alcançados por técnica de rapel de ascensão vertical em dossel)
4	Método de captura/coleta (Microorganismos)	Outros métodos de captura/coleta(Suabe de ninhos)

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	
2	Instituto C. Mendes de Cons. da Biodiversidade-ICMBio (Sede)	
3	Instituto de Ciencias Biomedicas	
4	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 64685649



Página 2/4





Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 41035-1	Data da Emissão: 11/10/2013 14:56	Data para Revalidação*: 10/11/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Frederico Fontanelli Vaz	CPF: 368.943.938-85
Título do Projeto: PERFIL SANITÁRIO DE FILHOTES DE AMAZONA BRASILIENSIS NO ESTADO DO PARANÁ: PARÂMETROS CLÍNICOS, HEMATOLÓGICOS E PESQUISA DE AGENTES INFECCIOSOS	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	CNPJ: 75.095.679/0001-49

### Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 64685649



Página 3/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 41035-1	Data da Emissão: 11/10/2013 14:56	Data para Revalidação*: 10/11/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Frederico Fontanelli Vaz	CPF: 368.943.938-85
Título do Projeto: PERFIL SANITÁRIO DE FILHOTES DE AMAZONA BRASILIENSIS NO ESTADO DO PARANÁ: PARÂMETROS CLÍNICOS, HEMATOLOGICOS E PESQUISA DE AGENTES INFECCIOSOS	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	CNPJ: 75.095.679/0001-49

\* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 64685649



Página 4/4

## 6.3 RESUMO APRESENTADO NO XVII CONGRESSO E XXIII ENCONTRO DA ABRAVAS 2014

Valores de referência para parâmetros de bioquímica plasmática em filhotes de papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) de vida livre

Reference values for plasma biochemical parameters in free-living Red-tailed Amazon parrot (*Amazona brasiliensis*) nestlings

Frederico Fontanelli Vaz<sup>1</sup>; Rosângela Locatelli Dittrich<sup>1</sup>; Olair Carlos Beltrame<sup>1</sup>; Elenise Angelotti Bastos Sipinski<sup>2</sup>; Maria Cecília Abbud<sup>2</sup>; Rafael Meirelles Sezerban<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Paraná (UFPR), Departamento de Medicina Veterinária, Curitiba, PR, Brasil

<sup>2</sup>Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental (SPVS), Curitiba, PR, Brasil

Contato: [fredfontanelli@yahoo.com.br](mailto:fredfontanelli@yahoo.com.br)

O papagaio-de-cara-roxa (*Amazona brasiliensis*) é um psitacídeo ameaçado, considerado uma espécie vulnerável de acordo com a International Union for Conservation of Nature.<sup>1</sup> Não existem informações sobre intervalos de referência (IR) nesta espécie, sendo importante para o monitoramento da saúde de sua população. É endêmico da Mata Atlântica, habitando a região do litoral sul de São Paulo ao litoral norte de Santa Catarina. O objetivo deste estudo foi estabelecer IR bioquímicos para filhotes de *Amazona brasiliensis* de vida livre. O estudo foi conduzido na Área de Proteção Ambiental de Guaraqueçaba, estado do Paraná, no período reprodutivo de dezembro de 2013 a janeiro de 2014. Ninhos artificiais foram alcançados por

meio da técnica de rapel em ascensão vertical em dossel. Os filhotes de papagaio-de-cara-roxa saudáveis ao exame físico foram incluídos no estudo. Amostras de sangue de 59 filhotes foram coletadas da veia ulnar superficial utilizando-se seringas estéreis de 1 mL com agulhas de insulina previamente heparinizadas (Figura 1). Posteriormente, as amostras foram inseridas em microtubos tipo eppendorf e refrigeradas a 4°C em isopor contendo gelo até o processamento no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná, no prazo máximo de 24 horas. O sangue foi centrifugado por cinco minutos para obtenção do plasma sanguíneo e determinação dos parâmetros



bioquímicos. As análises bioquímicas foram realizadas em analisador automatizado BS-200 da Mindray®. Os IR foram determinados utilizando um programa de Excel (Excel; Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) com o Reference Value Adviser versão 2.0,<sup>2</sup> seguindo diretrizes da American Society for Veterinary Clinical Pathology. Os IR estabelecidos encontram-se na Tabela 1. Os valores foram similares a outros já descritos na literatura em psitacídeos filhotes e adultos, de vida livre e cativeiro. Os resultados deste estudo podem servir como um procedimento de triagem para avaliar o estado de saúde geral dessa espécie ameaçada e avaliar possíveis alterações patológicas nos filhotes. São essenciais para avaliar efeitos das mudanças ambientais na população,

contribuir com a conservação da espécie e estabelecer um banco de dados para a mesma. Mais estudos devem ser encorajados para uma avaliação completa da saúde dessa população e contribuir para a conservação do papagaio-de-cara-roxa.

**Referências Bibliográficas:** 1) IUCN: Red List of Threatened Species. Version 2013. 2. Disponível em: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Acesso em 17 de julho de 2014. 2) Geffré A, Concordet D, Braun JP, Trumel C. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. *Vet Clin Pathol.* 2011;40:107–112 .



Figura 1. Colheita de sangue de filhote de papagaio-de-cara-roxa pela veia ulnar superficial.

**Tabela 1.** Valores bioquímicos de referência para filhotes saudáveis de *Amazona brasiliensis* de vida livre no estado do Paraná, sul do Brasil.

Parâmetro	Médias	DP	Amplitude		IR*
Bioquímico					
Ácido úrico mg/dL	1,2	0,4	0,6 - 2,6		0,6 - 2,4
Glicose mg/dL	231,7	23,5	174,7 - 297,4		183,4 - 277,5
AST U/L	154,3	32,2	106,8 - 231,8		87,5 - 216,7
LDH U/L	502,2	176,3	195,1 - 957,6		235,5 - 948,6
GGT U/L	3,0	2,7	0,1 - 8,8		0,1 - 7,8
CK U/L	579,8	238,1	102,3 - 1133,8		191,6 - 1120,1
Colesterol mg/dL	199,4	33,5	115,7 - 313,4		129,6 - 263,7 (S)
Proteína total g/dL	2,4	0,4	1,8 - 3,5		1,8 - 3,4
Albumina g/dL	1,3	0,2	0,9 - 2,1		0,9 - 1,9
Globulina g/dL	1,1	0,3	0,2 - 1,8		0,5 - 1,8
Relação A/G	1,1	0,3	0,67	2,17	0,7 - 2,0 (S)
Cálcio mg/dL	7,9	0,5	7,1	9,1	7,1 - 9,0
Fósforo mg/dL	4,4	0,7	3,2	5,9	3,2 - 5,9

DP indica desvio-padrão; Mín, Mínimo; Máx, máximo; IR, Intervalo de Referência.

\*(S) indica que outliers suspeitos estavam presentes.